

# **Biokonjugate als spezifische Formulierungsadditive für anti- Alzheimer Wirkstoffe**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

Im Fach Chemie  
Spezialisierung: Organische und Bioorganische Chemie

eingereicht

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

M. Sc. Carmen Lawatscheck geb. Stolze

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr.-Ing Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans G. Börner
2. Prof. Dr. Christian Hackenberger
3. Prof. Dr. Eckhard Mandelkow

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2019



## Abstract

Considerable efforts are devoted in Alzheimer Disease (AD) research to develop disease modifying drugs. Various studies have demonstrated that abnormal aggregation of Tau protein probably interrupts communication between cells leading to limitations of cognitive abilities, change of personality and problems in mastering daily life routines.<sup>[1]</sup> Tau protein aggregation can be inhibited and even preformed aggregates can be redissolved by small-molecule compounds.<sup>[2]</sup> Unfortunately, these molecules often can only be applied in limited biotests using dimethyl sulfoxide (DMSO) as co-solvent due to their poor water solubility and bioavailability. This represents a significant drawback since DMSO is suspected to influence important protein functions. Protein aggregation, degradation or denaturation as well as a change of its binding capacities are possible risks.<sup>[3]</sup> The solubilization of selected potential anti-AD drugs by tailored peptide-poly(ethylene glycol) (PEG) conjugates enabled the specific binding and subsequent release of these drugs in DMSO-free biotests. Four potential anti-AD drugs have been investigated in the presented work belonging to the class of *N*-phenylamines and rhodanines. For the design of the drug conjugate carriers, large peptide libraries have been screened using Raman or fluorescence microscopy-based methods to follow drug enrichment on certain peptide library beads which exhibit high drug affinity. Identification of peptide sequences of positive hits was performed by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-mass spectrometry (MS/MS) fragmentation. The corresponding conjugates were synthesized; loaded with the potential drugs and the resulting highly water-soluble drug transporter complexes were analyzed. Employing ultraviolet/visible (UV/Vis) spectroscopy, the maximum drug capacities of the conjugates were estimated. Almost equimolar drug:transporter ratios for all *N*-phenylamine complexes could be realized. Furthermore, loading of the peptide-PEG conjugates with the potential drugs led to formation of colloidal aggregates which was proved by dynamic light scattering (DLS). Compact and defined complexes are desirable with regard to biomedical applications. In general, particles exhibiting hydrodynamic radii ( $R_h$ ) of 5-50 nm and a PEG corona are suited best for dispersion in target tissue, penetration into small tissue capillaries and long blood circulation time.<sup>[4]</sup> Concerning the structure of the drug transporter complexes, the drugs are assumed to be bound by functionalities of the tailored peptides. For verification, various studies on drug-peptide interactions, specificity of drug binding and influence of the different parts of the conjugates for drug capacities were performed successfully. Most of the generated drug transporter complexes were finally tested in DMSO free bioassays. Both cell-free and cell tests were realized for a large number of complexes with regard to inhibition of Tau protein aggregation and disassembly of preformed aggregates. Depending on drug and peptide structures, the highly water-soluble complexes could reach effects comparable to the drugs solubilized by DMSO. The bioavailability of poor water-soluble anti-AD compounds was largely improved and enabled their application in DMSO-free biotests. Thus the concept of specific drug solubilization by tailored peptide-PEG conjugates was proved and extended to Raman-active compounds. Presumably, the new developed Raman-screening procedure can be expanded to a great extent of compounds suffering from unfavorable pharmacological characteristics.

## Kurzzusammenfassung

In der Alzheimer-Forschung (engl.: Alzheimer Disease, AD) wird immenser Aufwand zur Entwicklung von den Krankheitsverlauf verändernden Medikamenten betrieben. Studien zeigten, dass die abnormale Aggregation des Tau-Proteins offenbar zum Zusammenbruch der Zellkommunikation führt.<sup>[1a]</sup> Einschränkungen zahlreicher kognitiver Fähigkeiten, Persönlichkeitsveränderungen und Probleme bei der Bewältigung des Alltags der Betroffenen sind die Folgen.<sup>[1b]</sup> Niedermolekulare Substanzen, die die Tau-Protein-Aggregation inhibieren und sogar bereits gebildete Aggregate wieder auflösen können wurden entwickelt, sind jedoch oft aufgrund von schlechten Wasserlöslichkeiten bisher nur unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) in den Biotests einsetzbar.<sup>[2]</sup> Da DMSO z. B. die Aggregation, den Abbau oder die Denaturierung von Proteinen bewirken kann, ist der Ersatz des Co-Lösungsmittels von großer Bedeutung.<sup>[3]</sup> Durch das Design maßgeschneiderter Peptid-Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate war die spezifische Bindung und anschließende Freisetzung ausgewählter potentieller anti-AD-Wirkstoffe in DMSO-freien Biotests möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden vier potentielle anti-AD-Wirkstoffe untersucht, die zur Klasse der *N*-Phenylamine und Rhodanine gehören. Für den Entwurf der Wirkstoff-Transporter wurden Peptidbibliotheken mit Raman- und Fluoreszenz-Mikroskopie-basierten Methoden hinsichtlich der Anreicherung der Wirkstoffe an Peptiden mit hoher Wirkstoff-Bindekapazität getestet. Mithilfe von Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (engl.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) (MALDI)-Massenspektrometrie (MS/MS)-Fragmentierung konnten die Peptidsequenzen der positiven Treffer identifiziert werden. Die zugehörigen Konjugate wurden synthetisiert, mit den Wirkstoffen beladen und die entstehenden sehr gut wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexe analysiert. Zur Bewertung der Wirkstoffkapazitäten der Konjugate erfolgte die Vermessung der wässrigen Lösungen durch ultraviolette/sichtbare (engl.: ultraviolet/visible, UV/Vis) Spektroskopie. Bemerkenswerterweise konnten nahezu stöchiometrische Wirkstoff:Konjugat-Verhältnisse für alle *N*-Phenylamin-Komplexe realisiert werden. Der Beweis der Bildung kolloidal stabiler Aggregate bei der Beladung der Konjugate mit den Wirkstoffen gelang durch dynamische Lichtstreuungsexperimente (DLS). Für biomedizinische Anwendungen sind kompakte und definierte Systeme von Vorteil. Generell eignen sich Partikel mit hydrodynamischen Radien ( $R_h$ ) von 5-50 nm und einer PEG-Oberfläche hervorragend für die Verteilung im Zielgewebe sowie die Penetration in Gewebekapillaren und erreichen lange Blutzirkulationszeiten.<sup>[4]</sup> Zur Strukturaufklärung der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe konnten zahlreiche Untersuchungen erfolgreich durchgeführt werden. Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen, die Spezifität der Wirkstoffbindung und der Einfluss der verschiedenen Bestandteile der Konjugate auf die Wirkstoffkapazität konnten nachgewiesen werden. Viele der Komplexe wurden abschließend in DMSO-freien Biotests der Tau-Protein-Aggregation eingesetzt. Sowohl in den zellfreien als auch Zelltests erreichten die sehr gut wasserlöslichen Komplexe bedeutende Ergebnisse, die vor allem von der Wirkstoff- und Peptidstruktur der Systeme abhingen. Insgesamt wurde die Bioverfügbarkeit der schwerlöslichen anti-AD-Wirkstoffe durch die Solubilisierung mit maßgeschneiderten Peptid-PEG-Konjugaten enorm verbessert. Die auf Raman-aktive Substanzen erweiterte Screeningprozedur kann wahrscheinlich auf eine Großzahl von Wirkstoffen mit ungünstigen pharmakologischen Eigenschaften angewendet werden.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Kurzzusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Motivation und Zielsetzung .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>10</b>
2.1. Alzheimer-Krankheit.....	10
2.1.1. Vorkommen der Krankheit .....	10
2.1.2. Verlauf der Krankheit.....	11
2.1.3. Aktuelle Behandlungsstrategien .....	14
2.1.4. Entwicklung potentieller Wirkstoffe zur Änderung des AD-Verlaufs .....	16
2.1.5. Wirkstoffinduzierte Inhibition der Tau-Protein-Aggregation .....	19
2.2. Strategien zur Entwicklung von Wirkstoffen .....	21
2.3. Problematiken der Wirkstoffanwendung .....	22
2.3.1. Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen .....	23
2.3.2. Solubilisierung von Wirkstoffen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit .....	24
2.4. Entwicklung wirkstoffspezifischer Formulierungsadditive .....	27
2.4.1. Kombinatorische Konzepte .....	27
2.4.2. Peptid-Polymer-Konjugate als spezifische Löslichkeitsvermittler .....	28
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>33</b>
3.1. Design wirkstoffspezifischer Peptid-Polymer-Konjugate.....	33
3.1.1. Auswahlverfahren für Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffaffinität.....	33
3.1.2. Erstellung und Synthese wirkstoffspezifischer Peptidbibliotheken .....	35
3.1.3. Anreicherung der Wirkstoffe an spezifischen Trägern der Peptidbibliotheken .....	37
3.1.4. Identifikation von Bibliotheksträgern mit hoher Wirkstoffanreicherung durch Raman-Mikroskopie .....	38
3.1.5. Identifikation von Bibliotheksträgern mit hoher Wirkstoffanreicherung durch Fluoreszenz-Mikroskopie.....	44

3.1.6. Synthese wirkstoffaffiner Peptid-Polymer-Konjugate .....	46
3.2. Charakterisierung der Wirkstoff-Solubilisator-Systeme.....	53
3.2.1. <i>N</i> -Phenylamin B4A1 .....	53
3.2.2. Rhodanin bb14.....	69
3.2.3. Rhodanin bb17.....	71
3.2.4. Rhodanin bb15.....	74
3.3. Erweiterung des Peptid-Polymer-Konjugat-Konzepts .....	79
3.4. Anwendung der Wirkstoff-Transporter-Komplexe in <i>in vitro</i> Biotests der Tau-Protein-Aggregation .....	82
3.4.1. Zellfreie <i>in vitro</i> Untersuchungen zum <i>N</i> -Phenylamin B4A1 .....	85
3.4.2. <i>In vitro</i> N2a-Zellversuche zum <i>N</i> -Phenylamin B4A1 .....	98
3.4.3. Zellfreie <i>in vitro</i> Untersuchungen zu den Rhodaninen bb17 und bb15 .....	102
3.4.4. <i>In vitro</i> N2a-Zellversuche zu den Rhodaninen bb17 und bb15.....	106
 4. Zusammenfassung.....	 114
 5. Ausblick .....	 117
 6. Experimenteller Teil .....	 118
6.1. Materialien .....	118
6.2. Geräte.....	119
6.3. Screeningprozedur.....	121
6.3.1. Synthese der Peptidbibliotheken .....	121
6.3.2. Inkubation der Peptidbibliotheken.....	122
6.3.3. Analyse der inkubierten Peptidbibliotheksträger .....	122
6.3.4. Isolierung wirkstoffaffiner Bibliotheksträger und Vorbereitung für die MALDI-Analyse .....	124
6.3.5. Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate und Peptide .....	124
6.3.6. Charakterisierung der Peptid-Polymer-Konjugate.....	125
6.4. Charakterisierung der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe.....	150
6.4.1. Solubilisierungsexperimente.....	150
6.4.2. DLS-Experimente .....	154
6.4.3. Modellierung der Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen .....	156
6.5. Anwendung der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in Biotests.....	157
6.5.1. <i>In vitro</i> Tau Experimente.....	157

6.5.2. Zellapoptose.....	158
6.5.3. Inhibierung der Tau-Protein-Aggregation in N2a-Zelltests .....	158
 7. Literaturverzeichnis .....	 160
 8. Abkürzungsverzeichnis .....	 171
 Publikationsliste.....	 174
Beiträge der Autoren.....	175
Danksagung.....	177
Selbstständigkeitserklärung.....	178

# 1. Motivation und Zielsetzung

Gegenstand intensiver Forschung zur Heilung oder Vorbeugung menschlicher Krankheiten ist die Entwicklung neuer Medikamente. Der Entwicklungsprozess ist sowohl kostenintensiv als auch zeitaufwändig und die Erfolgsquote für den tatsächlichen Einsatz des Arzneimittels sehr gering.<sup>[5]</sup> Statistiken vorklinischer Studien zeigen, dass aus einer Auswahl von  $10^4$  potentiellen, den Krankheitsverlauf verändernden Wirkstoffen, letztendlich nur ein bis zwei zugelassene Medikamente entwickelt werden.<sup>[6]</sup> Die geringe Löslichkeit der potentiellen Wirkstoffe in wässrigen Lösungen spielt hierbei eine große Rolle, da die *in vivo* Bioverfügbarkeit durch schlechte Wasserlöslichkeiten stark eingeschränkt wird.<sup>[7]</sup> Insbesondere niedermolekulare und stark lipophile Moleküle sind Gegenstand der Medikamentenentwicklung. Dementsprechend besteht ein reges Interesse an Methoden zur direkten Wirkstoffuntersuchung.<sup>[8]</sup> So nutzen herkömmliche Methoden z. B. Zusatzlösungsmittel<sup>[9]</sup> oder Tenside<sup>[10]</sup> für die Solubilisierung der Wirkstoffe. Diese kostengünstigen Varianten basieren jedoch nicht auf spezifischen Wechselwirkungen, sodass eine gezielte Wirkstofffreisetzung nur bedingt möglich ist. Da die Anwendung nicht wasserlöslicher Wirkstoffe in Biotests meist Problematiken mit sich bringt, wird oft DMSO für eine verbesserte Löslichkeit zugesetzt. DMSO steht jedoch unter dem Verdacht, sich negativ auf wichtige Proteinfunktionen auszuwirken. Das erschwert die Interpretation der Testergebnisse, sodass die Ermöglichung DMSO-freier Tests sinnvoll erscheint.<sup>[3]</sup> Auch in der Forschung für anti-AD-Wirkstoffe treten Probleme hinsichtlich der Wasserlöslichkeit auf. Obwohl die Ursachen von AD noch nicht gänzlich geklärt sind, tragen wahrscheinlich Protein-Aggregationen zu einem großen Teil zum Krankheitsverlauf bei.<sup>[11]</sup> Extrazelluläre Ablagerungen des amyloiden  $\beta$ -Peptids (A $\beta$ ) und intrazelluläre Tau-Protein-Aggregate konnten in Gehirnen von AD-Patienten nachgewiesen werden.<sup>[12]</sup> Dementsprechend werden u. a. krankheitsmodifizierende Wirkstoffe zur Inhibition der A $\beta$ -Peptid- und Tau-Protein-Aggregation konzipiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten spezifische Formulierungsadditive für potentielle AD-Wirkstoffe entworfen werden. Dabei sollte zunächst auf eine etablierte Methode als Basis zurückgegriffen werden. Diese beinhaltet die Entwicklung von Peptid-Polyethylenglykol(PEG)-Konjugaten zur spezifischen Solubilisierung schwer löslicher Wirkstoffe. Am Beispiel einiger Kinase-Inhibitoren und dem Photosensibilisator *meta*-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC) konnte diese Methode erfolgreich angewendet werden.<sup>[13]</sup> Während die nicht-kovalente Bindung der Wirkstoffe über die Seitenketten der maßgeschneiderten Peptide erfolgte, wurde die Wasserlöslichkeit des entstehenden Konjugat-Wirkstoff-Komplexes durch den enthaltenen PEG-Block gewährleistet. Die Identifikation von Peptidsequenzen mit hoher Bindungsaffinität erfolgte dabei über ein Fluoreszenz-Mikroskopie-basiertes Screening festphasengebundener Peptidbibliotheken. Auf diesem Weg konnte die stark erhöhte Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe in anschließenden Biotests erfolgreich genutzt werden.<sup>[13]</sup> Da diese Methode jedoch fluoreszente Wirkstoffe voraussetzt, unterliegt sie starken Einschränkungen, da nur ein geringer Teil biologisch interessanter Substanzen Fluoreszenz aufweist.

Um eine weitaus größere Zahl aktiver Substanzen mit dieser Vorgehensweise solubilisieren zu können, sollte die ursprüngliche Fluoreszenz-Mikroskopie-basierte Screening-Prozedur anhand von anti-AD-Wirkstoffen auf Raman-aktive Wirkstoffe erweitert werden. Die Synthese maßgeschneiderter Peptid-Polymer-Konjugate sollte in der Bildung wasserlöslicher Wirkstoff-Konjugat-Komplexe resultieren, welche in DMSO-freien Biotests angewendet werden sollten.

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1. Alzheimer-Krankheit

#### 2.1.1. Vorkommen der Krankheit

Das heute als Alzheimer-Krankheit (engl.: Alzheimer's Disease, AD) bekannte Leiden wurde zuerst 1906 von Alois Alzheimer, einem deutschen Psychiater und Spezialisten der Neuroanatomie, am Fall der 50-jährigen Auguste D. erwähnt.<sup>[14]</sup> Sie litt an fortschreitenden kognitiven Einschränkungen, psychosozialer Inkompetenz, Wahnvorstellungen und Halluzinationen. Bei der Autopsie der Erkrankten wurden neurofibrilläre Bündel, Plaques und Arterienverkalkungen nachgewiesen.<sup>[15]</sup> Ein Großteil von Alzheimers Erkenntnissen trifft auch heutzutage noch auf unsere Beschreibung von AD zu.<sup>[1b]</sup>

Nach Krebs- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist AD aufgrund der weltweit gestiegenen Lebenserwartung zur dritthäufigsten Pathologie der Menschheit geworden.<sup>[16]</sup> AD und andere Demenzarten sind vor allem ein wachsendes Problem der modernen Gesellschaft. Medikamente und Lebensbedingungen können besonders in den Industrieländern, d.h. den westlichen Ländern mit höheren Einkommen, stetig verbessert werden und die Lebenserwartungen der Menschen drastisch steigern. Dies macht eine Zunahme der Krankheit unvermeidlich, da sie vor allem bei Menschen höheren Alters, bevorzugt ab 65 Jahren, auftritt.<sup>[17]</sup> So leiden ca. 6.4% aller älter als 65 Jahre alten Europäer an Demenz, davon ca. 4.4% an AD.<sup>[18]</sup> In Amerika gibt es laut Schätzungen bei Menschen ab 65 Jahren 11% AD-Fälle und sogar 32% bei den 85-Jährigen und Älteren.<sup>[19]</sup> Das entspricht schätzungsweise 5 Millionen AD-Fällen bei den über 65-jährigen Amerikanern. Vor allem der Vergleich mit anderen Krankheitsfällen verdeutlicht die Präsenz von AD. Schätzungen des Zentrums für Krankheitskontrolle und -vorbeugung (engl.: *Center for Disease Control and Prevention*) zufolge litten 2009-2012 von den erwachsenen Amerikanern ca. 10 Millionen an Diabetes, ca. 3 Millionen an Asthma, ca. 25 Millionen an Bluthochdruck und ca. 20 Millionen an Arthritis.<sup>[1b]</sup>

Weltweit erfahren schätzungsweise 3.9% aller 60-jährigen und älteren Menschen Demenzleiden, eine Zahl, von der angenommen wird, dass sie sich alle 20 Jahre verdoppelt.<sup>[20]</sup> So wird vorausgesagt, dass die Zahl der Demenzkranken weltweit (heute ca. 35 Millionen) im Jahr 2030 auf ca. 65 Millionen angestiegen sein wird.<sup>[1b]</sup> Insgesamt macht AD mit bis zu 75% den größten Anteil aller Demenzkrankheiten aus.<sup>[20]</sup> Dementsprechend hoch sind die Bemühungen in der Forschung hinsichtlich der Diagnostik und Behandlung von AD.

Derzeit können leider nur Medikamente, die die Symptome von AD lindern, eingesetzt werden, da noch keine krankheitsmodifizierenden Wirkstoffe entwickelt wurden. Der Krankheitsverlauf kann folglich weder verlangsamt noch rückgängig gemacht werden.<sup>[16]</sup> Ein Blick in die Zukunft der Medikamentenforschung ergibt, dass 2025 nur die krankheitsmodifizierende Therapien (engl.: Disease Modifying Therapies, DMTs) einsatzbereit sein könnten, die derzeit bereits die späte Phase 1 der Arzneimittelentwicklung

durchlaufen, da die Phase 1 ca. 13 Monate, Phase 2 ca. 28 Monate, Phase 3 ca. 51 Monate und die anschließenden regulatorischen Zulassungsverfahren ca. 18 Monate andauern.<sup>[21]</sup> Unglücklicherweise werden aktuell nur relativ wenige DMTs in klinischen Studien der Phase 1-3 getestet. Forschungsgegenstand sind ca. 66 niedermolekulare Substanzen, die u.a. DMTs beinhalten, ca. 7 aktive Immuntherapien und ca. 15 passive Immuntherapien, die meist auf Amyloide abzielen. Auf Tau und inflammatorischen Mediatoren basierende Strategien werden nach der Hauptstrategie „Amyloid“ am häufigsten untersucht.<sup>[21-22]</sup> Die in der dargestellten Arbeit untersuchten anti-AD-Wirkstoffe sind potentielle Inhibitoren der Tau-Protein-Aggregation (**vgl. Kapitel 2.1.2.**).

### **2.1.2. Verlauf der Krankheit**

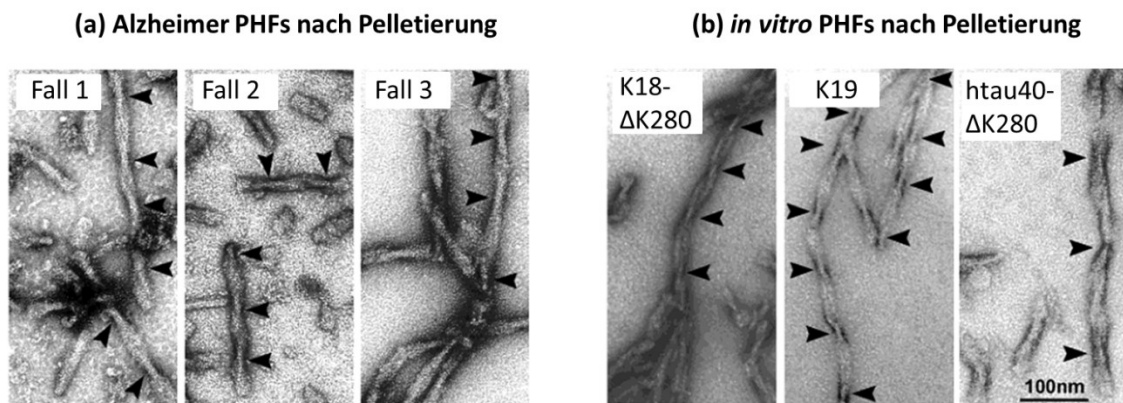
Ein zentrales Problem der Entwicklung von DMTs ist, dass die Ursachen von AD noch nicht vollständig geklärt sind.<sup>[11]</sup> Es wurden jedoch in allen untersuchten Gehirnen von AD-Patienten extrazelluläre Ablagerungen entdeckt, die vor allem das A $\beta$ -Peptid beinhalten. Dieses Peptid ist ein Spaltprodukt des integralen Membran-Amyloid-Precursor-Proteins (APP), das in vielen Nervenzellen exprimiert wird.<sup>[12]</sup> In Gehirnen von AD-Patienten kommt es vermehrt zur Spaltung von APP.<sup>[23]</sup> Die ursprüngliche Funktion des Proteins ist noch nicht in seiner Gesamtheit bewiesen, wahrscheinlich trägt es jedoch zum Neuriten-Auswuchs,<sup>[24]</sup> zur Zellmigration und zur Signaltransduktion bei.<sup>[25]</sup>

Abgesehen von den A $\beta$ -Peptid-Ablagerungen bilden sich in Gehirnen von AD-Patienten intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (engl.: Neurofibrillary Tangles, NFTs) aus. Diese setzen sich aus fehlerhaft phosphoryliertem Tau-Protein zusammen, das im Krankheitsverlauf aggregiert.<sup>[12]</sup> Bei gesunden Menschen dient das Tau-Protein, ein hochlösliches, nativ ungefaltetes Protein mit hauptsächlich hydrophilen Seitenketten und undefinierter dreidimensionaler Struktur, der Stabilisierung von Mikrotubuli-Netzwerken in neuronalen Axonen.<sup>[26]</sup> Auf diese Weise wird der Transport von Organellen und Vesikeln in den Nervenzellen ermöglicht. Jegliche interzelluläre Kommunikation und infolgedessen auch die Gehirnaktivität sind von diesem Transport abhängig.<sup>[1a]</sup> Die zytotoxischen A $\beta$ -Peptid- und Tau-Protein-Aggregate bilden sich, indem sich  $\beta$ -Stränge axial aufeinander schichten und somit Fasern aus Proteinuntereinheiten ausbilden. Es generiert sich ein gekreuztes  $\beta$ -Faltblatt im Filamentzentrum. Dieser Mechanismus stellt eine Form der Amyloidaggregation dar.<sup>[26]</sup>

Für die Medikamentenentwicklung sind sowohl die Inhibition der A $\beta$ - als auch Tau-Aggregation von immenser Bedeutung. Die Fragestellung, ob die Amyloid- oder Tau-Hypothese der richtige Ansatz ist, konnte noch nicht endgültig beantwortet werden. Allerdings litt die  $\beta$ -Amyloid-Hypothese unter zahlreichen Fehlschlägen in den klinischen Phasen 2 und 3. Im Gegensatz dazu befinden sich die Tau-basierenden Studien erst am Anfang,<sup>[27]</sup> da bisher nur eine auf Tau abzielende Therapie Phase 3 erreicht hat, während schon 10 amyloide Studien in dieser Phase durchgeführt wurden.<sup>[22]</sup> Mittlerweile gibt es aber zahlreiche Hinweise, dass die Kombination aus löslichem A $\beta$ - und Tau-Protein zu AD führen könnte, auch wenn sich deren Aggregationsarten unterscheiden.<sup>[28]</sup> Möglicherweise müsste im Hinblick auf die erfolgreiche Behandlung von AD nach Kombinationsansätzen bei DMTs

gesucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation gelegt.

Im Krankheitsfall von AD liegt das Tau-Protein in einem hyperphosphorylierten Zustand vor. Dadurch ist der intrazelluläre Transport unterbrochen, da Tau nicht mehr an Mikrotubuli bindet, um diese zu stabilisieren.<sup>[29]</sup> Es kommt zur Depolymerisation der Mikrotubuli und im Zytoplasma bildet das Tau-Protein unlösliche Oligomere aus, die zu Protomeren aggregieren. Formen diese Paare, so bilden sich die sogenannten gepaarten helikalen Filamente (PHFs).<sup>[25]</sup> Diese setzen sich aus zwei umeinander geschlungenen Filamenten zusammen,<sup>[26]</sup> die normalerweise eine Länge von 100-500 nm, eine Breite von 10-25 nm und eine helikale Ganghöhe von ca. 80 nm aufweisen (**Abb. 1**).<sup>[30]</sup>

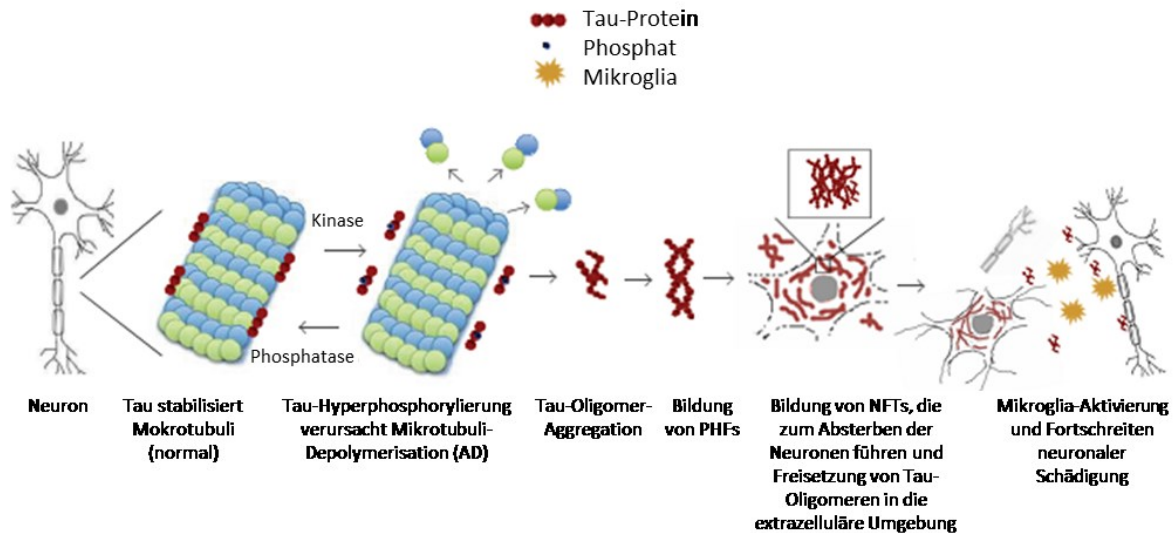


**Abb. 1.** Elektronenmikroskopiebild (Negativanfärbung) von *in vitro* polymerisierten PHFs, die aus Gehirnen von AD-Patienten gewonnen wurden. (a) Extrahierte PHFs von drei individuellen AD-Gehirnen. (b) Durch das Polyanion Heparin generierte PHFs des Tau-Proteins *in vitro*. Der überwiegende Teil der gezeigten PHFs weist die typische Breite von 10-25 nm und eine Wiederholungseinheit von ca. 80 nm auf. Adaptiert mit Erlaubnis von S. Barghorn, P. Davies, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2004**, 43, 1694-1703. Copyright 2004 American Chemical Society.

Durch Selbst-Organisation der PHFs bilden sich wiederum NFTs im Gehirn der AD-Patienten.<sup>[25, 31]</sup> Diese führen zum Absterben von Neuronen,<sup>[25]</sup> woraufhin Tau-Oligomere extrazellulär freigesetzt werden. Die dadurch aktivierten Mikrogliazellen tragen zu einem weiteren Fortschreiten der Degeneration von Neuronen bei (**Abb. 2**).<sup>[32]</sup>

Genauer betrachtet wird die Aggregation des Tau-Proteins durch kurze Peptidmotive gefördert, die eine sehr hohe Neigung zur Ausbildung von  $\beta$ -Strukturen aufweisen.<sup>[33]</sup> Das Zentrum der PHFs bilden die Hexapeptidmotive <sup>275</sup>VQIINK<sup>280</sup> und <sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>,<sup>[34]</sup> die sich in der Tau-"Repeat-Domäne" (Tau<sub>RD</sub>) des Proteins (Repeatsequenz R2 und R3) befinden und die zu dessen Aggregation führen.<sup>[35]</sup> Tau<sub>RD</sub> gliedert sich in drei oder vier Teile von Wiederholungssequenzen, die jeweils aus 31 Aminosäuren aufgebaut sind. Beim alternativen Spleißen kann die Wiederholungssequenz R2 in einigen Isoformen fehlen.<sup>[26]</sup> Von den sechs Hauptisoformen des Tau-Proteins, die im Zentralnervensystem (ZNS) eines erwachsenen Menschen vorkommen,<sup>[26]</sup> ist htau40 das längste Isoform.<sup>[16]</sup> Das verkürzte Konstrukt K18 ist von htau40 abgeleitet und setzt sich aus den vier Repeatdomänen R1, R2, R3 und R4 zusammen.<sup>[34]</sup>

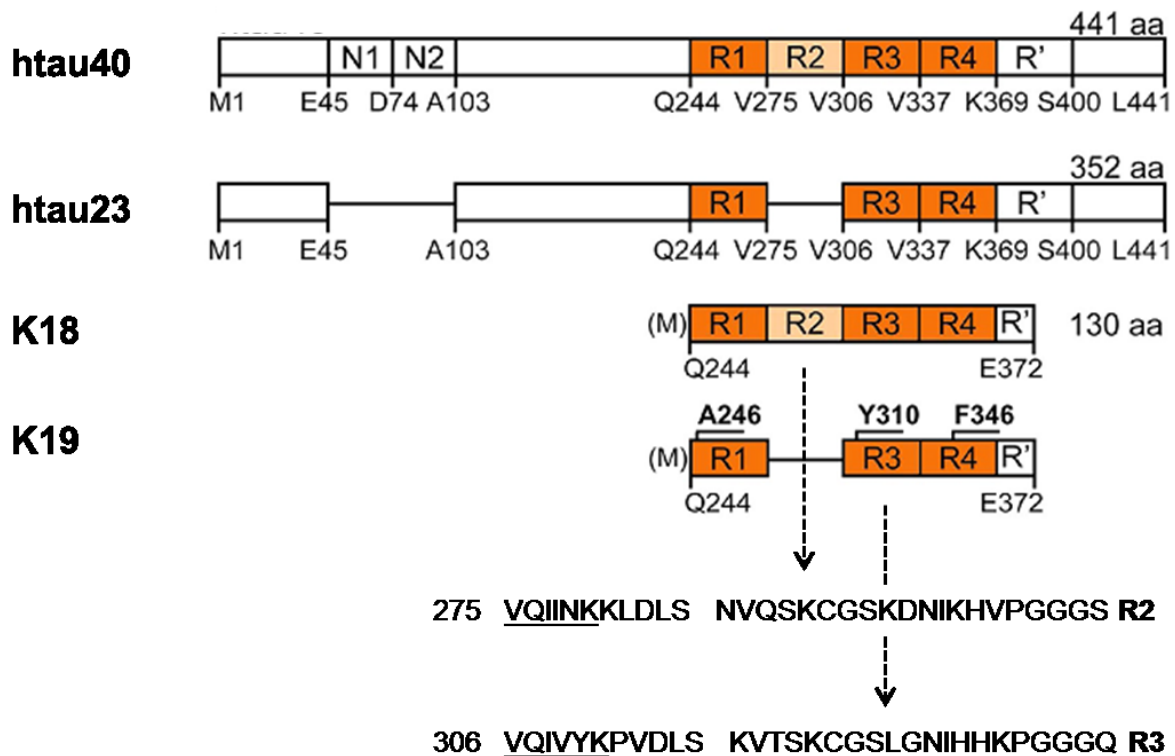




**Abb. 2.** Fortschreiten von AD: Kinasen und Phosphatasen kontrollieren im Normalfall die Mikrotubuli-Stabilisierung durch das Tau-Protein. Im Krankheitsfall tritt jedoch eine fortwährende Depolymerisation der Mikrotubuli aufgrund der abnormalen Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins auf. Infolgedessen bilden sich im Zytoplasma unlösliche Tau-Oligomere, die über die Ausbildung von Protomeren, dann PHFs und schließlich NFTs zum Absterben der Neurone führen. Die Freisetzung extrazellulärer Tau-Oligomere aktiviert Mikrogliazellen, die zu einem weiteren Fortschreiten der neuronalen Degeneration führen. Abgebildet mit Erlaubnis von <sup>[25]</sup>. Copyright 2013 Sara H. Mokhtar et al.

Die etwas kürzere Abwandlung von htau40, das fetale Tau-Isoform htau23, wurde als Vorbild für das Tau-Konstrukt K19 herangezogen, das die Repeat-Domänen R1, R3 und R4 von htau23 aufweist.<sup>[36]</sup> So kann ein kompakteres System aufgebaut werden, das leichter zu synthetisieren ist, aber dennoch mit dem Kern der PHF-Struktur übereinstimmt. Die zugehörigen PHFs des Konstrukts K19 ähneln den PHFs aus Gehirnen von AD-Patienten sehr stark,<sup>[30a]</sup> sodass die durch K19-Biotests erworbenen Erkenntnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf AD-spezifische Aggregationsprozesse zutreffen. Außerdem enthält das Konstrukt K19 das Hexapeptidmotiv <sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>, das die Aggregation fördert.<sup>[33]</sup> Für ein automatisiertes Verfahren des Wirkstoff-Screenings ist das Konstrukt K19 daher passend, da es innerhalb kurzer Zeit mit verlässlicher Reproduzierbarkeit zu PHFs aggregiert (**Abb. 3**).<sup>[26]</sup>

Beim Einbau von Mutationen im Hexapeptidmotiv ist das Tau-Protein nicht mehr fähig zu aggregieren, wenn diese wie Prolin die  $\beta$ -Struktur unterbrechen. Auf der anderen Seite kann die Protein-Aggregation durch Hinzufügen einer Mutation, die die Bildung von  $\beta$ -Strukturen unterstützt, auch verstärkt werden.<sup>[35]</sup> So führt z. B. das Einfügen von Prolin (I277P, I308P) dazu, dass keine Aggregation des Proteins mehr auftritt, während das im Mutant K18 $\Delta$ K280 fehlende Lysin (K280) eine verstärkte Protein-Aggregation auslöst.<sup>[1a]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend mit dem Tau-Konstrukt K19 gearbeitet.



**Abb. 3.** Übersicht der Tau-Protein-Isoforme htau40 und htau23 des ZNS eines Menschen und der davon abgeleiteten Konstrukte K18 und K19. Das Hexapeptidmotiv <sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>, das in allen Isoformen und Konstrukten enthalten ist, initiiert die Tau-Protein-Aggregation.<sup>[33]</sup> Ebenfalls aggregationsfördernd ist das Hexapeptid <sup>275</sup>VQIVYK<sup>280</sup>, welches in htau40, htau23 und K18 vorkommt. Adaptiert mit Erlaubnis von V. Daebel, S. Chinnathambi, J. Biernat, M. Schwalbe, B. Habenstein, A. Loquet, E. Akoury, K. Tepper, H. Müller, M. Baldus, C. Griesinger, M. Zweckstetter, E. Mandelkow, V. Vijayan, A. Lange, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 13982-13989. Copyright 2012 American Chemical Society.

### 2.1.3. Aktuelle Behandlungsstrategien

Das Wissen um die Mechanismen der Aβ- und Tau-Aggregation brachte zahlreiche Erkenntnisse zur Entwicklung potentieller anti-AD-Wirkstoffe mit sich (**vgl. Kapitel 2.1.2.**). Dennoch sind bisher keine den Krankheitsverlauf verändernden Medikamente verfügbar. Daher konzentrieren sich aktuelle Behandlungsstrategien für AD lediglich auf die Linderung der Symptome der Patienten.<sup>[37]</sup> Die Betroffenen leiden unter Einschränkungen zahlreicher kognitiver Fähigkeiten wie dem Sprach- und Urteilsvermögen und der Fähigkeiten der Orientierung und der Aufmerksamkeit. Außerdem kommt es meist zu drastischen Änderungen der Persönlichkeit und des sozialen Verhaltens. Die Patienten sind zunehmend weniger in der Lage, ihr tägliches Leben mit Routine-Aktivitäten wie Autofahren, Kochen, Haushaltsführung, Einkaufen, Finanzhaushalt und Körperpflege allein bewältigen zu können.<sup>[1b]</sup>

So werden für milde bis moderate AD-Erkrankungen vor allem Cholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil, Rivastigmin oder Galantamin eingesetzt.<sup>[38]</sup> Demzugrunde liegt die

„cholinerge Hypothese“, nach der Gedächtnisverlust und damit verbundene kognitive Beeinträchtigungen in den Gehirnen älterer und dementer Menschen vor allem durch Störungen der cholinergen Aktivität ausgelöst werden.<sup>[39]</sup> Es kommt zu verminderter Cholinaufnahme, der Freisetzung des wichtigen Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) und dem zunehmenden Verlust cholinergischer Neuronen.<sup>[37]</sup> Auch der Verlust nikotinischer Rezeptoren könnte zu Verschlechterungen des Gedächtnisses und der Wahrnehmung führen.<sup>[40]</sup> Eine Abmilderung der Abnahme der kognitiven Fähigkeiten sollte dementsprechend durch eine Verbesserung der cholinergischen Funktion, d.h. der Inhibition des Acetylcholinabbaus, erreicht werden können.<sup>[37, 41]</sup>

Welcher der Cholinesterase-Inhibitoren dem AD-Patient verabreicht wird, hängt von der Verträglichkeit des Wirkstoffs für den Patienten ab und inwiefern mit dem jeweiligen Inhibitor die therapeutische Dosis erzielt werden kann. Ist dies mit einem Wirkstoff nicht der Fall, so kann der Wechsel zu einem anderen hilfreich sein.<sup>[39]</sup> So sprachen in einer Studie z.B. 56% der Patienten, bei denen keine erfolgreiche Behandlung mit Donepizil möglich war, auf die Behandlung mit Rivastigmin an. Die Fähigkeiten der Patienten hinsichtlich der Bewältigung des Alltags konnten bei 57% der Patienten verbessert werden. 49% der Betroffenen erzielten durch das Medikament Erfolge hinsichtlich der kognitiven Leistungen.<sup>[42]</sup> Allerdings gibt es nur eine eingeschränkte Zahl klinischer Studien, die die Auswirkungen des Wechsels von Wirkstoffen auf AD-Patienten darstellen.<sup>[43]</sup>

Zur Linderung moderater bis schwerer Formen von AD erfolgt der Einsatz des *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonisten Memantin.<sup>[38]</sup> Dieser wirkt gezielt im Hippocampus und Cortex-Teil des Gehirns, die entscheidend für das Gedächtnis, die Wahrnehmung und Lernprozesse sind.<sup>[44]</sup> Bei diesen Vorgängen übertragen Neurotransmitter Erregungen von einer Nervenzelle auf die andere. Glutamat ist ein erregender Neurotransmitter, der in 70% aller erregenden Synapsen des ZNS als Neurotransmitter fungiert.<sup>[45]</sup> Störungen im glutamatergen Neurotransmitter-System könnten folglich einen großen Beitrag zum Verlauf von AD haben.<sup>[37]</sup> Ein dabei involvierter Glutamat-Rezeptor ist der NMDA-Rezeptor, der mehrere Bindungsstellen für NMDA und Glutamat aufweist<sup>[39]</sup> und gehäuft im Hippocampus auftritt.<sup>[45]</sup> Er gehört zu den ionotropen Glutamatrezeptoren – Ionenkanäle der Zellmembran, die durch den Liganden Glutamat aktiviert werden.<sup>[45]</sup> Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ermöglicht einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss in Neuronen, der möglicherweise einen Beitrag zur Langzeitpotenzierung leistet. Diese ist entscheidend für kognitive Leistungen wie die Gedächtnisfähigkeit und Lernvorgänge.<sup>[46]</sup> Bei AD wird angenommen, dass der Anstieg von extrazellulärem Glutamat die übermäßige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zur Folge hat. Die anschließende Anhäufung von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Zellen führt über mehrere Schritte schließlich zum Absterben von Neuronen.<sup>[47]</sup> Der nicht-kompetitive NMDA-Antagonist Memantin kann möglicherweise durch Störungen des glutamergen Systems gefährdete Neuronen schützen. Gleichzeitig unterbindet er die physiologische NMDA-Rezeptoraktivierung nicht.<sup>[39]</sup>

Auch wenn es Hinweise auf Potential zur Neuroprotektion gibt,<sup>[48]</sup> ist die Linderung der AD-Symptome durch Acetylcholinesterase-Inhibitoren, bzw. Memantin nur von kurzer Dauer.<sup>[49]</sup> Zusätzlich treten in allen Stadien von AD auch Verhaltensstörungen und psychologische Symptome von Demenz auf. Diese Symptome nehmen im Laufe des Krankheitsverlaufes zu.<sup>[50]</sup> Sie können durch Cholinesterase-Inhibitoren und Memantin beeinflusst werden.<sup>[50]</sup> Allerdings zeigen diese Medikamente keine hohe Wirksamkeit bei vorangeschrittener Erkrankung und müssen mit anderen Wirkstoffen kombiniert werden.<sup>[50]</sup> So werden z. B.

selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (engl.: Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, SSRIs) für die Behandlung von Depressionen, die im Zusammenhang mit AD auftreten, eingesetzt.<sup>[51]</sup> Es gelang auf diese Weise, Depressionen einzudämmen, was zu geringeren Verhaltensauffälligkeiten und einer besseren Beherrschung des Alltags bei AD-Patienten führte. Eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten war jedoch nicht möglich.<sup>[52]</sup> Gemütserrregungen und Psychose können ebenfalls mit SSRIs behandelt werden.<sup>[50]</sup> Eine andere Studie bezweifelt wiederum den Nutzen der am häufigsten verschriebenen SSRIs Sertralin und Mirtazapin.<sup>[53]</sup>

So ist es insgesamt möglich, die Symptome von AD durch Medikamente wie Cholinesterase-Inhibitoren, Memantin oder SSRIs für eine begrenzte Zeit zu lindern. Die Entwicklung krankheitsmodifizierender Wirkstoffe befindet sich jedoch noch in der experimentellen und klinischen Phase und soll im Folgenden näher erläutert werden.

#### **2.1.4. Entwicklung potentieller Wirkstoffe zur Änderung des AD-Verlaufs**

Die Entwicklung potentieller anti-AD-Wirkstoffe umfasst viele Forschungsansätze. Derzeitig zielt die am häufigsten verfolgte Strategie auf die Aggregation des A $\beta$ -Peptids ab. Forschungen in diese Richtung brachten potentielle Wirkstoffe wie die Antikörper Aducanumab<sup>[54]</sup> und Gantenerumab,<sup>[55]</sup> sowie den Beta-Sekretase-Inhibitor Elenbecestat<sup>[56]</sup> hervor.

Abgesehen von der Amyloid-Strategie werden auch inflammatorische Mediatoren als Wirkstoffkandidaten untersucht. Hierzu erfolgten u. a. Studien mit dem niedermolekularen Wirkstoffen GC 021109<sup>[57]</sup> und Neflamapimod<sup>[58]</sup> oder dem Protein Etanercept.<sup>[59]</sup>

Die dritte häufig zugrundeliegende Strategie der Wirkstoffentwicklung betrifft die Aggregation des Tau-Proteins, die wahrscheinlich zur Degeneration von Neuronen beiträgt.<sup>[26]</sup> Dies soll mittels niedermolekularer Wirkstoffe unterbunden werden, die die Tau-phosphorylierenden Kinasen inhibieren sollen, da NFTs als Kernbestandteil hyperphosphorylierte Tau-Aggregate aufweisen.<sup>[60]</sup> Eine andere Klasse von potentiellen Wirkstoffen soll den Aggregationsprozess des Tau-Proteins inhibieren.<sup>[1a]</sup> Die Forschung der vorliegenden Arbeit basiert auf dem zweiten Ansatz und wird im Folgenden näher erläutert.

Zur Auffindung von Wirkstoffen zur Inhibition der Tau-Protein-Aggregation und der Deaggregation von Tau-Protein-Aggregaten wurde eine Bibliothek von 200 000 Substanzen nach den Lipinski-Regeln aufgestellt.<sup>[61]</sup> Diese besagen, dass eine schlechte Absorption, bzw. Permeation eines Wirkstoffs, eher wahrscheinlich ist, wenn die Substanz mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren, zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, ein Molekulargewicht > 500 Da aufweist und der berechnete Log P > 5 ist.<sup>[61]</sup> Alle ausgewählten Substanzen wurden in einem Primärscreening getestet.<sup>[36, 62]</sup> Nur 0.63% der gescreenten Verbindungen zeigten eine hohe inhibitorische Wirkung.<sup>[36]</sup> Die Versuche wurden mit dem Tau-Konstrukt K19 durchgeführt.<sup>[35]</sup> Durch andere Arten von Biotests und Tests mit weiteren Tau-Konstrukten und-Isoformen konnten die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.<sup>[35]</sup> Mithilfe eines Fluoreszenz-Assays erfolgte die Bewertung der Wirksamkeit der potentiellen Tau-Aggregationsinhibitoren.<sup>[26]</sup> Da sich die Fluoreszenz-Intensität des Farbstoffs Thioflavin S

(ThS) proportional zum Grad der K19-Aggregation verändert, konnte diese Methode zur Quantifizierung der Tau-Protein-Aggregation genutzt werden. ThS weist in Anwesenheit von PHFs und einer Anregung von 440 nm eine starke Fluoreszenz-Emission bei 521 nm auf.<sup>[26]</sup> Damit ist die Intensität der Fluoreszenz im ThS-Assay ein Maß für die Tau-Protein-Aggregation. Die reproduzierbare Induzierung der Aggregation des Tau-Proteins wurde durch das Polyanion Heparin gewährleistet.<sup>[36]</sup>

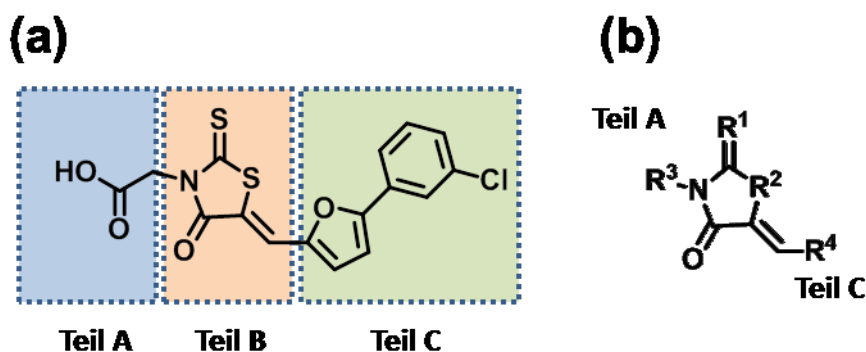
In einem zweiten Screening wurden die aktivsten Substanzen zusätzlich auf ihre Fähigkeit untersucht, bereits gebildete Tau-Protein-Aggregate wieder aufzulösen. Insgesamt konnten 0.04% aller Ausgangsverbindungen PHFs mit 80%iger Effizienz disassemblieren.<sup>[26, 36]</sup> Eine detailliertere Beschreibung des Screeningverfahrens erfolgt in **Kapitel 3.4.**

Die multifunktionellen potentiellen anti-AD-Wirkstoffe können in verschiedene chemische Gruppen eingeteilt werden: Thioxothiazolidinone (Rhodanine), *N*-Phenylamine, Anthrachinone, Phenylthiazolyhydrazide, Phenothiazine, Benzothiazole und Polyphenole.<sup>[35]</sup> Gegenstand der vorliegenden Forschungsergebnisse sind das *N*-Phenylamin B4A1 und die potentiellen Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15, Vertreter der Rhodanine (**Abb. 4**). Im Folgenden sollen die strukturellen Merkmale und deren Auswirkung auf die Effizienz der inhibitorischen Wirkung näher erläutert werden.

Der Einfluss der chemischen Struktur der verschiedenen *N*-Phenylamin-Derivate auf die Inhibition der Tau-Aggregation und die Deaggregation von PHFs hängt von der Fähigkeit des potentiellen Wirkstoffs ab, Wasserstoffbrückenbindungen durch die entsprechenden Substituenten wie Nitrogruppen oder Carbonsäuren ausbilden zu können. Auch das Auftreten aromatischer Substituenten kann durch Ausbildung von hydrophoben, bzw. Stapelwechselwirkungen zur Aktivität der potentiellen Wirkstoffe beitragen.<sup>[35]</sup> *N*-Phenylamine sind im Allgemeinen etwas stärker zytotoxisch als die restlichen chemischen Gruppen der potentiellen Wirkstoffe.<sup>[26]</sup> Im Vergleich zu den Rhodaninen und Phenylthiazolyhydraziden ergaben sie geringere Wirksamkeiten, sowohl in den zellfreien Biotests als auch in den Zellversuchen. Wahrscheinlich resultierte die geringere Aktivität aus der nichtplanaren Konformation der *N*-Phenylamine um die Rotationsachse der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung.<sup>[16]</sup>

Die als nicht-mutagen eingestuften Rhodaninderivate<sup>[63]</sup> sind generell beliebt für die Entwicklung potentieller Wirkstoffe, da sie sich durch hohe Aktivitäten auszeichnen.<sup>[1a]</sup> Eine Langzeitstudie mit dem Rhodaninderivat Epalrestat bewies dessen gute Verträglichkeit.<sup>[64]</sup> Im Screening-Verfahren für potentielle Tau-Aggregationsinhibitoren und die Deaggregation von PHFs erfolgten Untersuchungen von einer Vielzahl von Rhodaninderivaten. Es wurden verschiedene Aktivitäten der potentiellen Wirkstoffe bezüglich der Variation der Carboxylgruppe ermittelt (**Abb. 4, Teil A**). So führte z. B. die Veresterung der Säure oder der Ersatz der Carboxylgruppe durch Imidazol oder Benzimidazol zu einer geringeren Aktivität der Wirkstoffe bei der PHF-Deaggregation. Tests mit verschiedenen Längen des Linkers zwischen Carboxylgruppe und dem Rhodaninkern (**Abb. 4, Teil B**) zeigten ebenfalls deutliche Unterschiede in der inhibitorischen Wirkung der Substanzen, jedoch kaum Veränderungen in deren Deaggregationsaktivität.<sup>[1a]</sup> Substitutionen im Biarylteil C ergaben, dass der Furanheterozyklus eine entscheidende Rolle für eine gute Aktivität der potentiellen Wirkstoffe spielte. So ergaben sich geringere Wirksamkeiten für Substanzen mit Thiophen- oder Pyridinheterozyklen im Teil C der Rhodaninderivate. Ursachen hierfür könnten die

verschiedenen sterischen und elektronischen Eigenschaften der funktionellen Gruppen sein.<sup>[26]</sup> Die Variation der Position am Ende der Seitenkette (**Abb. 4, Teil C**) war flexibel mit nur geringen Aktivitätsveränderungen möglich. Es konnten sogar sperrige Substituenten wie Adamantyl oder Ferrocen eingebaut werden oder eine geladene Gruppe wie die Carboxylgruppe.<sup>[1a]</sup>



**Abb. 4.** Übersicht von Inhibitoren der Tau-Protein-Aggregation. Dargestellt ist die Klasse der Rhodanine. (a) Dreigeteilte Struktur der Wirkstoffe mit dem zentralen Rhodaninkern (Teil B). Variationen sind in den Teilen A und C möglich, können sich jedoch auf die Aktivitäten der Substanzen auswirken. (b) Darstellung der Variationen des Rhodaninzentrums ( $R^1$  und  $R^2$ ) und der benachbarten Regionen ( $R^3$  und  $R^4$ ). Adaptiert von B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, *Angewandte Chemie International Edition*<sup>[1a]</sup> mit Erlaubnis von John Wiley and Sons. Copyright 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Für die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation und die Deaggregation von PHFs ist der Rhodaninkern von großer Bedeutung, da die Thioxogruppe und Amidgruppe besonders effektiv Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können.<sup>[65]</sup> Oft werden weitere Wasserstoffbrücken-Akzeptoren durch Einbau von Carboxylgruppen, Nitrogruppen, Sulfonaten/Sulfonamiden oder Phenolen hinzugefügt.<sup>[26]</sup> Für eine gute Aktivität des potentiellen Wirkstoffs scheint eine aromatische Seitenkette zudem von Vorteil zu sein, da diese zur Ausbildung von hydrophoben- bzw. von Stapelwechselwirkungen neigt.<sup>[26]</sup>

Insgesamt betrachtet zeigten die verschiedenen Klassen der Tau-Aggregationsinhibitoren vielversprechende Ergebnisse in zellfreien *in vitro* Biotests. Die aktivsten der Substanzen wurden anschließend in einem Zellmodell mit Maus-Neuroblastom-Zelllinien des Typs N2a/K18 $\Delta$ K280 eingesetzt.<sup>[66]</sup> Hierbei enthalten die Zellen das Tau-Konstrukt K18 mit der Deletionsmutation  $\Delta$ K280, das sich durch seine hohe Neigung zur Aggregation für Zelltests eignet.<sup>[66]</sup> Im Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zelltests erfolgt eine ausführlichere Beschreibung des Biotests (vgl. **Kapitel 3.4.**). Einige der Rhodanine wurden bereits in einer *in vivo* Studie mit Zebrafisch-Embryonen getestet, in der 24 h und 72 h nach der Befruchtung nur geringe Zytotoxizitäten auftraten.<sup>[67]</sup> In einem weiteren Tiermodell mit *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurden unter anderem das Rhodanin bb14, das Phenylthiazolyhydrazid BSc3094, das Phenothiazin Methyleneblau und cmp 16, ein Pyridazin, getestet.<sup>[68]</sup> Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation zur Neuroprotektion der Tiere beitragen kann.<sup>[68]</sup> Für alle beschriebenen

Biotests ist der Mechanismus der Wirkstoff-Tau-Interaktion von großem Interesse. Im Nachfolgenden sollen die dazu bisher erlangten Kenntnisse zusammengestellt werden.

### **2.1.5. Wirkstoffinduzierte Inhibition der Tau-Protein-Aggregation**

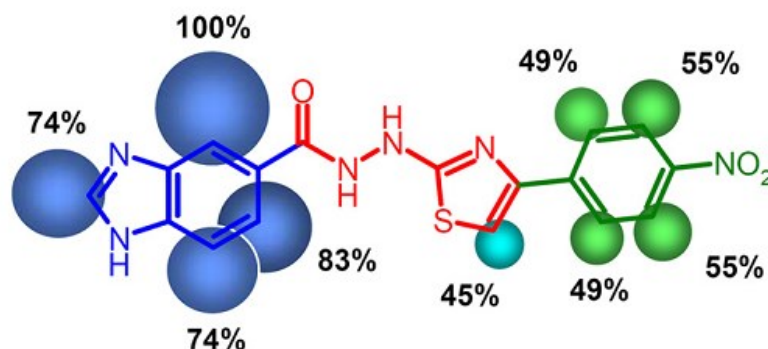
Für die Entwicklung potentieller Wirkstoffe zur Inhibition der Tau-Protein-Aggregation und zur Deaggregation bereits gebildeter PHFs sind Erkenntnisse zum Bindungsmodus der Wirkstoffe an Tau(aggregate) essentiell. Da dem Aggregationsvorgang von Tau-Monomeren zu PHFs vielstufige Prozesse zugrundeliegen, existieren vermutlich einige verschiedene Stellen am Tau-Protein, an die potentielle Wirkstoffe binden können und so die Tau-Protein-Aggregation unterbinden-, bzw. bereits gebildete Aggregate wieder auflösen können.<sup>[69]</sup> Auch erste Sättigungstransfer-Differenz (engl.: saturation transfer difference, STD)-Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance, NMR) -Untersuchungen zur Aufklärung der Strukturen früher Aggregationsintermediate und der zugehörigen Komplexe unterstützen diese Annahme.<sup>[35]</sup> Möglicherweise können die identifizierten Inhibitoren gebildete Fibrillen disassemblieren, indem das Monomer oder oligomere Strukturen aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen PHF und monomerem Tau-Protein entfernt werden.<sup>[26]</sup> Vor allem Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen potentiellen Wirkstoffen und gereiften Fibrillen scheinen eine Rolle zu spielen. Dabei könnten die Inhibitoren die Ausrichtung der  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen der Tau-Aggregate unterbrechen. In jedem Fall weisen die potentiellen Wirkstoffe verschiedene Bindungsmodi und Stellen im Inhibitions- oder Deaggregationsmechanismus auf, da es nur selten zu Übereinstimmungen zwischen den Werten ihrer mittleren inhibitorischen Konzentration (engl.: half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) und halbmaximalen Induktion der Deaggregation (engl.: half maximal disassembly-inducing concentration,  $DC_{50}$ ) kam.<sup>[26]</sup>

Die Bildung der PHFs aus dem löslichen Tau-Protein erfolgt in einem kinetischen Gleichgewicht aus Tau-Monomeren, Tau-Oligomeren und Tau-Polymeren. Dabei formen die Repeat-Sequenzen des löslichen Tau-Proteins die Aggregationskerne der Intermediate, die schließlich durch weitere Aggregation PHFs ausbilden.<sup>[36]</sup> Die potentiellen Wirkstoffe können zur Verhinderung der Tau-Aggregation, bzw. der PHF-Deaggregation, sowohl an den monomeren, als auch oligomeren oder polymeren Tau-Formen angreifen.

Für einige potentielle Wirkstoffe wurden konkrete STD-NMR-Experimente hinsichtlich der Wirkstoff-Tau-Interaktion durchgeführt. So wurde z. B. das Phenylthiazolyldiazin BSc3094, einer der aktivsten anti-AD-Wirkstoffe,<sup>[70]</sup> ausführlich in seiner Wechselwirkung mit dem Tau-Konstrukt K18 untersucht (**Abb. 5**). Die Titrationsergebnisse für das Proton mit dem höchsten STD-Effekt (Normierung auf 100%) lieferten eine Dissoziationskonstante von 62  $\mu$ M für den Wirkstoff-K18-Komplex.<sup>[70]</sup> Das STD-NMR zeigte eine offenbar starke Interaktion des Benzimidazolrings des Inhibitors mit K18 (Darstellung in blau).  $\pi\pi$ - und hydrophobe Wechselwirkungen scheinen dementsprechend im Inhibitionsmechanismus eine bedeutende Rolle zu spielen.<sup>[35]</sup> Hohe STD-Intensitäten traten auch für die nitroaromatischen Protonen auf, die auf spezifische Bindungen zwischen potentielltem Wirkstoff und K18 hindeuten (Darstellung in grün).<sup>[16]</sup> Die gleichen oder sich ähnelnde Bindungsstellen an Tau,

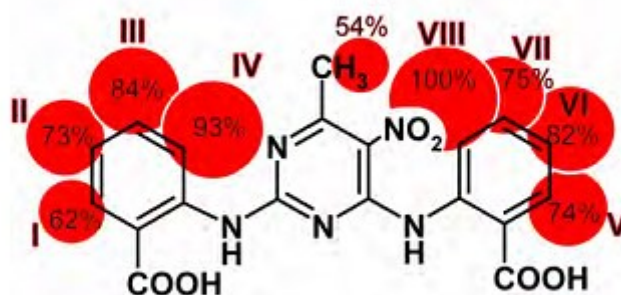


die für Thiazolyldiazine auftreten, sind wahrscheinlich auch für Rhodanine entscheidend, da sich die Strukturen der Grundgerüste der beiden Inhibitorklassen ebenfalls ähneln.<sup>[26]</sup>



**Abb. 5.** Bindungsepitope des Komplexes aus dem Tau-Aggregations-Inhibitor BSc3094 und dem Tau-Konstrukt K18 zur Darstellung der Bindungsaffinitäten. Aufgeführt sind die relativen STD-NMR-Effekte, die die jeweiligen Bindungsaffinitäten zum Tau-Protein ausdrücken (Darstellung in %, proportionale Größe der Kreise bezogen auf den zugehörigen STD-NMR-Effekte für das jeweilige Proton). Abgebildet mit Erlaubnis von <sup>[35]</sup> und M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E.-M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2007**, 46, 10016-10023. Copyright 2007 American Chemical Society.

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Wirkstoff B4A1 wurde ebenfalls auf seine Bindungsweise an Tau getestet. Für alle Protonen des potentiellen Wirkstoffs konnten deutliche STD-Effekte gemessen werden (**Abb. 6**). Zur Darstellung des Bindungsepitops erfolgte die Normierung der STD-Effekte auf das größte Signal, das sich für das ortho-Proton des der Nitrogruppe zugewandten Benzylrings ergab. Durch weiterführende Titrationsexperimente wurden Dissoziationskonstanten zwischen 8  $\mu$ M und 97  $\mu$ M für alle Protonen für die Bindung an K18 ermittelt. Mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie wurden ebenfalls spezifische Wechselwirkungen bei der Komplexbildung zwischen B4A1 und K18 nachgewiesen.<sup>[71]</sup>



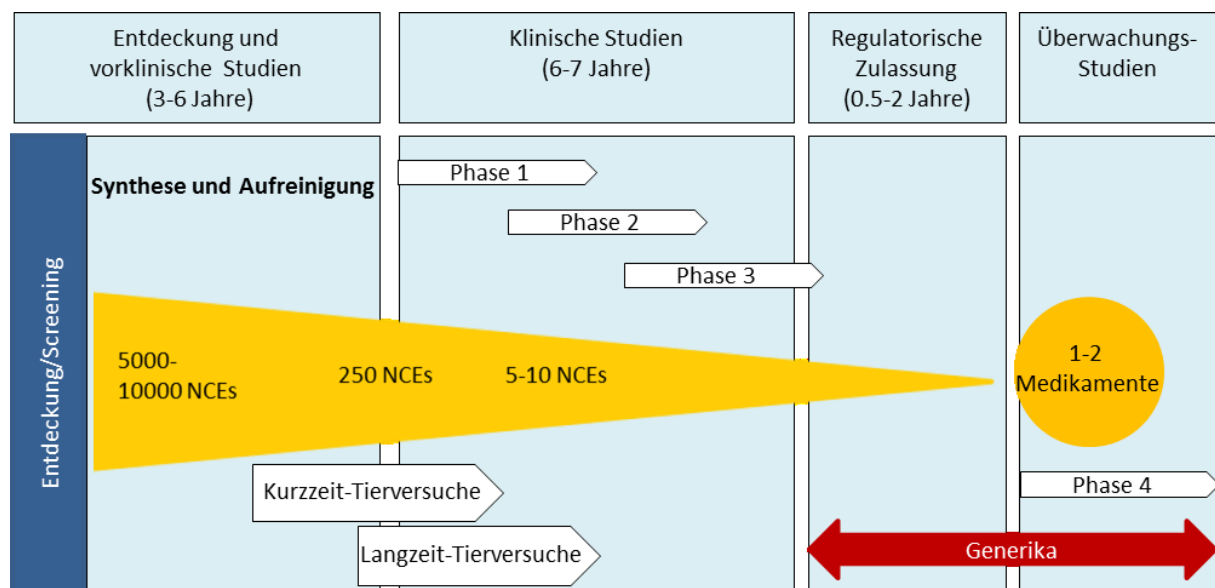
**Abb. 6.** Bindungsepitop des potentiellen Tau-Aggregations-Inhibitors B4A1 und dem Tau-Konstrukt K18 zur Darstellung der Bindungsaffinitäten. Aufgeführt sind die relativen STD-NMR-Effekte (Darstellung in %, proportionale Größe der Kreise beziehen sich auf den zugehörigen STD-NMR-Effekt für das jeweilige Proton). Abgebildet mit Erlaubnis von <sup>[71]</sup>.



Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass obwohl durchaus einige Kenntnisse zur Pathologie von AD vorliegen, noch viele ungeklärte Ursachen des Leidens existieren. A $\beta$ - und Tau-Protein-Aggregation tragen wahrscheinlich zum Krankheitsverlauf bei. Durch die Entwicklung von Wirkstoffen, die das abnormale Verhalten der Proteine unterbinden sollen, wurde eine Vielzahl von aktiven Substanzen identifiziert. Im nachfolgenden Teil soll der Verlauf der Wirkstoffentwicklung und dessen verschiedene Phasen und Problematiken näher untersucht werden.

## 2.2. Strategien zur Entwicklung von Wirkstoffen

Eine immense Zahl älterer Menschen ist von leichten bis schweren Formen von AD betroffen (vgl. **Kapitel 2.1.1.**). Da bisher keine krankheitsmodifizierenden Wirkstoffe verfügbar sind, können nur die Symptome der Patienten gelindert werden (vgl. **Kapitel 2.1.3.**). Um eine Verbesserung der Lage der Erkrankten zu erreichen, ist der Entwurf und die Entwicklung neuer Wirkstoffe notwendig. Allgemein muss für die Entwicklung eines wirksamen Medikaments ein langer (ca. 15 Jahre) und kostenintensiver (durchschnittlich 880 Millionen US-Dollar) Prozess durchschritten werden. Beachtlich ist auch die Zahl der verworfenen Vorläufermedikamente – sie beträgt ca. 90% am Ende der klinischen Versuche.<sup>[72]</sup> Die Entwicklung neuer Biopharmazeutika setzt sich aus der Entdeckung der neuartigen eigenständigen Substanzen (engl.: New Chemical Entities, NCEs) in vorklinischen Studien und ihrer Entwicklung in klinischen Studien zusammen. So werden von 10 000 den Krankheitsverlauf verändernden NCEs, nur fünf bis zehn an Menschen getestet und lediglich ein bis zwei NCEs zu einem verkäuflichen Medikament umgesetzt (**Abb. 7.**)<sup>[6]</sup>



**Abb. 7.** Schematische Darstellung des Prozesses der Wirkstoffentwicklung. Ausgehend von ca. 10 000 NCEs erreichen nur fünf bis zehn der Substanzen den Einsatz in klinischen Studien. Insgesamt werden nur ein bis zwei vermarktungsfähige Medikamente erhalten. Abgebildet mit Erlaubnis von <sup>[6]</sup>. Copyright 2013 Dunne et al.

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe werden Substanzen mit einigen gemeinsamen physikalischen und chemischen Eigenschaften in Substanzbibliotheken mit bis zu einigen Millionen verschiedener Moleküle zusammengefasst. Diese können nach dem klassischen Verfahren des Hochdurchsatzscreenings (engl.: High-Throughput Screening, HTS) untersucht werden. Die Herstellung und Untersuchung all dieser Substanzen ist zum einen sehr kosten- und zeitintensiv,<sup>[73]</sup> zum anderen kommt das sogenannte Hochdurchsatz virtuelle Screening (engl.: High-Throughput Virtual Screening, HTVS) immer mehr zum Tragen.<sup>[74]</sup> Durch den Einsatz von computergestützten Auswertungsmethoden können die Bibliotheken schnell und kostengünstig getestet werden.<sup>[73]</sup>

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, den Bereich der zu synthetisierenden Substanzen schon im Vorhinein einzugrenzen. Hierbei ist es besonders wichtig, dass die Design-Experten von verschiedenen Fachbereichen wie der medizinischen, synthetischen, physikalischen und theoretischen Chemie eng zusammenarbeiten und ihr Wissen effektiv teilen. So kann die kleinstmögliche Anzahl von Durchläufen der Designstrategien zur Auffindung von Wirkstoffen gewährleistet werden.<sup>[75]</sup>

Das Wirkstoffdesign unterteilt sich in das Ligand-basierte Wirkstoffdesign (engl.: Ligand-based Drug Design, LBDD) und das Struktur-basierte Wirkstoffdesign (Structure-based Drug Design, SBDD).<sup>[76]</sup> Generell erfolgt beim Verfahren des Wirkstoffdesigns die Auswahl eines Targets in der Ursachenforschung einer Krankheit. Anschließend wird nach Substanzen geforscht, die das Target aktivieren oder inhibieren.<sup>[77]</sup>

LBDD wird genutzt, wenn keine dreidimensionalen Informationen des Proteintargets (Rezeptor) vorliegen. In diesem Fall erfolgt der Ausgangspunkt des Designs von den Liganden des Proteintargets.<sup>[78]</sup> Häufig genutzte Strategien sind die quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung (engl.: Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR), Pharmacophor-Modelle und Ansätze zur molekularen Ähnlichkeit.<sup>[79]</sup>

Beim SBDD wird die bekannte Struktur des Targets zum Entwurf eines geeigneten Inhibitors genutzt.<sup>[76]</sup> Dieser iterative Vorgang beginnt mit dem ersten Zyklus – dem Klonen, Aufreinigen und der Strukturbestimmung des Proteintargets. Nach der anschließenden computersimulierten Positionierung der Wirkstoffe einer Datenbank an ausgewählte Stellen des Targets werden die Wirkstoffe auf Grundlage der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle des Targets bewertet. In biochemischen Tests werden die aktivsten Substanzen eingesetzt. Im zweiten Zyklus erfolgt die Strukturaufklärung des Wirkstoff-Target-Komplexes mit einer vielversprechenden Leitstruktur vom ersten Zyklus, die Optimierungsvorschläge für die Struktur des potentiellen Wirkstoffs zutagefordert. Dieser Optimierungszyklus wird meist noch mehrfach wiederholt, sodass schließlich targetspezifische Wirkstoffe erhalten werden.<sup>[80]</sup>

## **2.3. Problematiken der Wirkstoffanwendung**

Die in Kapitel 2.2. beschriebenen Prozeduren zur Entwicklung von Wirkstoffen liefern eine Vielzahl von aktiven Substanzen. Obwohl die Wirkstoffkandidaten über wertvolle Eigenschaften im Hinblick auf das Wirkstofftarget verfügen, treten oftmals Probleme bei der

Anwendung der Substanzen in physiologischer Umgebung auf. Dazu werden allgemein Leiden oder Symptome gezählt, die im Zusammenhang mit Wirkstoff-Medikationen auftreten und die Patienten beeinträchtigen.<sup>[81]</sup> Diese wirkstoffbedingten Probleme werden in Nebenwirkungen, unerwünschte Ereignisse oder Reaktionen und unerwartete, unerwünschte Ereignisse unterteilt.<sup>[82]</sup> Ein sehr zentrales und auf eine Großzahl von potentiellen Wirkstoffen zutreffendes Problem in Anwendungen ist die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen. Da diese auch für die in der Arbeit untersuchten Wirkstoffe von zentraler Bedeutung ist, wird sie im Folgenden näher erläutert.

### 2.3.1. Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen

Die Bioverfügbarkeit entspricht dem Anteil an absorbiertem, nicht-metabolisiertem Wirkstoff bezogen auf die verabreichte Dosis des Wirkstoffs. Geringe Bioverfügbarkeiten drücken sich demnach durch eine geringe Permeation durch Biomembranen oder eine schlechte Wasserlöslichkeit aus. Zudem verteilt sich ein Wirkstoff mit geringer Bioverfügbarkeit in biologischen Flüssigkeiten nur langsam, ist bei physiologischem pH-Wert instabil oder wird schnell metabolisiert.<sup>[83]</sup>

Um eine gute orale Absorption erreichen zu können, wurde das Konzept der maximal absorbierbaren Dosis (engl.: maximum absorbable dose, MAD) eingeführt, mithilfe derer die benötigte Löslichkeit und Permeabilität eines Wirkstoffes abgeschätzt werden kann.<sup>[84]</sup> Der Zusammenhang zwischen Löslichkeit und Permeabilität kann außerdem mithilfe des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (Biopharmaceutics Classification System, BCS) hergestellt werden.<sup>[85]</sup> Mit diesem System wird die Löslichkeit eines Wirkstoffs *in vitro* mit der *in vivo* Bioverfügbarkeit in Zusammenhang gestellt. Demnach werden die Wirkstoffe in vier Klassen unterteilt: 1) Sehr gut wasserlösliche, hochpermeable Wirkstoffe, 2) Schlecht wasserlösliche, hochpermeable Wirkstoffe, 3) Sehr gut wasserlösliche, schlecht permeable Wirkstoffe und 4) Schlecht wasserlösliche, schlecht permeable Wirkstoffe. Die Wirkstoffe werden einer hohen Permeabilität zugeordnet, wenn sie zu mehr als 90% absorbiert werden. Als sehr gut löslich gelten Wirkstoffe, wenn sie sich in der höchsten therapeutischen Einzeldosis in 250 mL Wasser (im Bereich des gastrointestinalen pH-Werts 1.2-7.5) vollständig lösen.<sup>[86]</sup> Mithilfe des BCS ist die Vorraussage möglich, unter welchen Bedingungen kein *in vitro-in vivo*-Zusammenhang für einen potentiellen Wirkstoff zu erwarten ist. Dies trifft z.B. auf aktive Substanzen mit hoher Löslichkeit und geringer Permeabilität zu.<sup>[85]</sup>

Besonders die schlecht wasserlöslichen Wirkstoffe sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeit, da aktuelle Strategien der kombinatorischen Chemie (**vgl. Kapitel 2.4.1.**) vor allem zur Entwicklung stark lipophiler Substanzen beitragen, die oftmals eine schlechte Wasserlöslichkeit mit sich bringen. So weisen ca. 40% der industriell verwendeten Wirkstoffe und fast 90% der Substanzen in der Entwicklungsphase eine schlechte Wasserlöslichkeit auf.<sup>[87]</sup> Verschiedene Methoden zur Verbesserung der Löslichkeit der aktiven Substanzen werden in Kapitel 2.3.2. dargestellt.

### 2.3.2. Solubilisierung von Wirkstoffen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit

Das häufigste Problem in der Anwendung von potentiellen, neu entwickelten Wirkstoffen ist oft deren schlechte Wasserlöslichkeit. Diese überlagert alle anderen Anforderungen, die an aktive Substanzen in der Entwicklung gestellt werden, wie Stabilität, Permeabilität und geeignete Dissoziationskonstanten.<sup>[88]</sup> Der Begriff der Hydrophobie wird in verschiedene Stufen unterteilt. Gering lösliche Wirkstoffe lösen sich zu 1-10 mg/mL, sehr gering lösliche können im Bereich 0.1-1 mg/mL gelöst werden und faktisch unlösliche Wirkstoffe erreichen lediglich eine Löslichkeit von < 0.1 mg/mL.<sup>[89]</sup>

Die verschiedenen Strategien zur Erhöhung der Löslichkeit von Wirkstoffen können in drei Kategorien eingeteilt werden: (1) physikalische Modifikationen, (2) chemische Modifikationen und (3) andere Techniken. Während die physikalischen Modifikationen auf Grundlage von Änderungen der Kristalleigenschaften, Partikelgrößen und der Dispergierung von Wirkstoffen einhergehen, werden in den chemischen Modifikationstechniken z. B. Derivatisierungen oder Komplexierungen der aktiven Substanzen durchgeführt. Weitere Techniken beinhalten u. a. den Einsatz unspezifischer Tenside oder Solubilisatoren (**Abb. 8**).<sup>[90]</sup>



**Abb. 8.** Übersicht einiger Strategien zur Erhöhung der Löslichkeit von Wirkstoffen.<sup>[90]</sup>

Um Partikelgrößen von Wirkstoffen zu reduzieren, werden in den physikalischen Modifikationstechniken z. B. die herkömmliche, mechanische Zerkleinerung oder Methoden des kontrollierten Wirkstoffpartikel-Engineerings angewendet.<sup>[91]</sup> Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen ist der Einsatz pharmazeutischer Co-Kristalle. Auch bei dieser physikalischen Methode wird die chemische Zusammensetzung der Wirkstoffe nicht verändert. Die Bildung der Co-Kristalle erfolgt aus mindestens zwei oder mehreren molekularen Einheiten, zwischen denen sich schwache, intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden.<sup>[92]</sup> Für das Design eines pharmazeutischen Co-Kristalls wird in

Abhängigkeit der Wirkstoffstruktur nach einem geeigneten Co-Kristallbildner gesucht. Dieser muss eine gute Verträglichkeit aufweisen und geeignete Wechselwirkungen mit dem Wirkstoff eingehen können.<sup>[93]</sup> Beispiele für Co-Kristallbildner sind Salicylsäure, Adipinsäure, Fumarsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Nicotinsäureamid und Terephthalaldehyd.<sup>[94]</sup>

Etwas komplizierter gestalten sich die chemischen Modifikationen zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen. Die Technik der Änderung des pH-Werts unterliegt z. B. dem Problem, dass die pH-Werte innerhalb des Magen-Darm-Traktes von 1.0-7.5 variieren.<sup>[95]</sup> So können die Wirkstoffe bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich stabil sein oder in unterschiedlichen ionisierten Formen vorliegen. Somit kann sich die Wasserlöslichkeit und Aktivität der Wirkstoffe je nach pH-Wert der Umgebung stark verändern. Zur Lösung dieser Problematik werden z. B. Hilfsstoffe wie Tabletten oder Kapseln eingesetzt, die den pH-Wert der Umgebung beeinflussen können.<sup>[96]</sup>

Abgesehen von der Beeinflussung der Wirkstoffstabilität durch den pH-Wert der physiologischen Umgebung können Komplexierungen von Wirkstoffen zu enormen Verbesserungen der Bioverfügbarkeit führen. Die Komplexierungen können in Form von Koordinations-Komplexen, Einschluss-Komplexen, Pharmakosomen oder organischen molekularen Komplexen erfolgen.<sup>[97]</sup> So werden z. B. in der Behandlung von Krebserkrankungen Metallkomplexe auf der Basis von Platin, Ruthenium, Kupfer, Gold oder Silber eingesetzt.<sup>[98]</sup> Einschlussverbindungen gehören zu einer Art der chemischen Komplexe, die den nicht-kovalenten Einschluss eines Moleküls innerhalb eines anderen Moleküls, bzw. einer Anordnung von Molekülen umfassen. Das eingeschlossene Gast-Molekül muss dabei in die feste Form des umgebenden Gastgeber-Moleküls passen, dessen Hohlraum z. B. eine tunnel-, käfig- oder schichtartige Form aufweisen kann.<sup>[99]</sup> Der Einschluss-Komplex zwischen  $\alpha$ -Cyclodextrin und PEG ist ein prominentes Beispiel für diese Klasse von Verbindungen.<sup>[100]</sup> Eine weitere Möglichkeit der Löslichkeitsverbesserung von Wirkstoffen stellen Pharmakosome dar, die zur Klasse der lipiden Verabreichungssysteme von Wirkstoffen gehören. Diese können kolloidale Mizellen oder Vesikel bilden oder in Form von Wirkstoffdispersionen vorliegen.<sup>[101]</sup> In organischen molekularen Komplexen sind Substrat und Ligand im dynamischem Gleichgewicht nicht-kovalent über Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder elektrostatische Wechselwirkungen gebunden. Verschiedene Komplexarten wie Wirkstoff-Wirkstoff-, Wirkstoff-Polymer- oder Wirkstoff-Protein-Komplexe sind bekannt.<sup>[97]</sup> In der vorliegenden Forschungsarbeit sollten ebenfalls schwerlösliche Wirkstoffe in Form von organischen molekularen Komplexen gebunden werden. Die Trägersubstanzen sollten in diesem Fall Peptid-PEG-Konjugate sein, die für jeden Wirkstoff maßgeschneidert werden. Eine detailliertere Beschreibung des Komplexaufbaus erfolgt in **Kapitel 2.4.2.**

Um die Löslichkeit saurer oder basischer Wirkstoffe zu verbessern, wird häufig die Strategie der Salzbildung eingesetzt.<sup>[102]</sup> Dabei wird das Wirkstoffmolekül, das ionisierbare funktionelle Gruppen aufweisen muss, mit einem passenden Gegenion gepaart. Intermolekulare, ionische Wechselwirkungen zwischen ionisiertem Wirkstoff und ionisiertem Gegenion führen bei geeigneten Bedingungen zur kristallinen Salzbildung (**Abb. 9**).<sup>[103]</sup> Für die Auswahl eines Salzes mit passendem Gegenion muss die Form der Wirkstoffverabreichung, die Dosierungsform und die Verträglichkeit des Gegenions berücksichtigt werden.

Ausschlaggebend ist aber vor allem die Azidität oder Basizität der ionisierbaren Gruppen des Wirkstoffmoleküls.<sup>[104]</sup>



**Abb. 9.** Schematische Darstellung der Salzbildung zur Erhöhung der Löslichkeit von Wirkstoffen. Abgebildet mit Erlaubnis von <sup>[103]</sup>.

Eine drastischere chemische Modifikationsmethode als z. B. die Komplex- oder Salzbildung mit schwer bioverfügbaren Wirkstoffen ist deren Derivatisierung. Durch diese Strategie kann die Wirksamkeit der oralen Verabreichung von Wirkstoffen gesteigert werden, indem ein wasserunlöslicher Wirkstoff zu einem wasserlöslichen Wirkstoffvorläufer umgesetzt wird. So können z. B. Hydroxyl-, Carboxyl- oder Aminofunktionalitäten mit einer Vorläufergruppe verestert werden. Diese Gruppe unterbindet oder ionisiert intermolekulare Wechselwirkungen. Dadurch ist eine verbesserte Wasserlöslichkeit des schwer löslichen Wirkstoffs erreichbar. Allerdings ist durch diese Methode eine Reduktion der Wirkstoffaktivität zu erwarten.<sup>[105]</sup>

Von anderweitigen, nicht-physikalischen und nicht-chemischen Modifizierungsmethoden von unlöslichen Wirkstoffen ist die Nutzung von Adjuvanten im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von Bedeutung. Die am häufigsten genutzte Strategie der Pharmaindustrie zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Wirkstoffen ist die Verwendung von Co-Lösungsmitteln. Dabei wird ein nicht-toxisches, zugelassenes organisches Lösungsmittel wie PEG, Glycerin oder Ethanol mit Wasser gemischt.<sup>[106]</sup> Außerdem werden Hilfsstoffe wie Cremophor ELP, ein bereits in klinischen Studien genutztes, unspezifisch bindendes Formulierungsadditiv, zur Solubilisierung unlöslicher Wirkstoffe genutzt.<sup>[107]</sup> Auch Pluronics®, ein herkömmlich eingesetzter Löslichkeitsvermittler, wird häufig verwendet.<sup>[108]</sup>

Der Vergleich dieser Vielzahl von Möglichkeiten zur Solubilisierung von unlöslichen Wirkstoffen führte dazu, dass der Ansatz der Löslichkeitsvermittlung durch Bindung des Wirkstoffs in organischen molekularen Komplexen für die vorliegende Arbeit gewählt wurde. Diese Methode zeichnet sich besonders dadurch aus, dass der Wirkstoff nicht modifiziert und nicht-kovalent durch ein inaktives Polymer gebunden wird. Eine effiziente Freisetzung des Wirkstoffs in Anwendungen wie Biotests ist zudem zu erwarten.

### 2.4. Entwicklung wirkstoffspezifischer Formulierungsadditive

Nachdem die Wahl von organisch molekularen Komplexen zur Formulierung von unlöslichen Wirkstoffen für die vorliegende Arbeit getroffen wurde (**vgl. Kapitel 2.3.2.**), stellte sich die Frage nach den Auswahlkriterien für die Trägersubstanzen. Hierfür kamen vor allem kombinatorische Strategien in Frage, die im Folgenden zusammengefasst werden.

#### 2.4.1. Kombinatorische Konzepte

Mithilfe der kombinatorischen Chemie wurde die Darstellung einer großen Anzahl verschiedener Substanzen in kurzer Zeit möglich. So kann ein Chemiker auf traditionellem Wege lediglich 300-400 Substanzen im Jahr herstellen, während auf Grundlage der kombinatorischen Chemie Tausende bis Millionen von Stoffen auf einmal dargestellt werden können.<sup>[109]</sup> Die kombinatorische Chemie umfasst alle Methoden, die, ausgehend von großen Mengen an Startmaterial, die simultane chemische Synthese einer großen Anzahl von Substanzen ermöglichen. Auf diese Weise entstehen ganze Bibliotheken, die alle durch die verwendeten Synthesemethoden theoretisch möglichen Substanzkombinationen enthalten.<sup>[110]</sup>

Eine gängige Synthesemethode für kombinatorische Bibliotheken ist das *Split-und-Mix-Verfahren*. Dafür wird die verwendete Festphase in x Portionen aufgeteilt und an jede Teilmenge je eine Substanz gekuppelt. Anschließend werden alle Portionen durchmischt, wieder in x Portionen geteilt und jede Teilmenge erneut mit je einer Substanz umgesetzt. Nach n-facher Durchführung dieser Prozedur werden  $x^n$  verschiedene Produkte erhalten.<sup>[111]</sup> Eine weitere Form der Darstellung von Substanzbibliotheken ist die kombinatorische Synthese in Lösung. Sie kann entweder von einer Sammlung von Substanzen oder von bestimmten Substanzen erfolgen.<sup>[112]</sup> Insgesamt sind Daten, die beim Screenen von Poolbibliotheken gewonnen werden, weniger zuverlässig als jene, die beim Screening von bestimmten Substanzen erhalten werden. Besonders auf analytischer Ebene bringt eine Bibliothek von einer Sammlung von Substanzen Schwierigkeiten mit sich.<sup>[112]</sup>

Für die Darstellung von Peptidbibliotheken wird oft das auf den Forschungen von Merrifield<sup>[113]</sup> basierende Prinzip der Peptid-Festphasensynthese (engl.: Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) angewendet. Dabei werden Harzkügelchen als Trägermaterialien für die Peptidsynthese eingesetzt, die reaktive, funktionelle Gruppen enthalten, welche kovalent gebunden sind.<sup>[114]</sup> Während früher Polystyrolharze mit einem geringen Vernetzungsgrad von 2-5% am häufigsten genutzt wurden, sind heute mit 1% Divinylbenzol vernetzte, PEG-Polystyrolharze die am meisten für die organische Synthese an der Festphase genutzten Trägermaterialien.<sup>[115]</sup> Ausgehend von der Startfunktionalität des Harzes können eine Vielzahl von Aminosäuren an das Harz gekuppelt und anschließend über die Spaltung dieser Funktionalität das gewünschte Peptid vom Harz abgespalten werden.<sup>[114]</sup> Meilensteine der Peptidbibliotheksdarstellung in der kombinatorischen Chemie waren z. B. die chemische Synthese von Peptidbibliotheken durch die Kupplung von Aminosäuremischungen (1986)<sup>[116]</sup> und die biologische Methode der Peptidbibliothekssynthese (1990).<sup>[117]</sup>

Interessanterweise ist auch die Darstellung von aus Block-Copolymeren aufgebauten Substanzbibliotheken möglich. Dafür werden reaktive Polymere nachträglich mit zahlreichen ebenfalls reaktiven Verbindungen umgesetzt. So wurde z. B. eine Bibliothek aus wasserlöslichen Polymeren aus Poly(pentafluorphenylmethacrylat) (PPFMA) synthetisiert.<sup>[118]</sup> Durch Umsetzung mit verschiedenen Aminen konnten modifizierte Copolymere von PPFMA erhalten werden. Diese eignen sich gut für biomedizinische Anwendungen, da nachgewiesen werden konnte, dass sie keine erhöhte Toxizität aufweisen.<sup>[119]</sup> Ein weiteres Beispiel ist die Darstellung einer Bibliothek aus Polymethacrylamiden aus Poly(*N*-Methacryloxy-succinimid).<sup>[120]</sup>

Ein Spezialfeld der Block-Copolymere ist das der Peptid-Polymer-Konjugate. Da diese Substanzklasse im Fokus der vorliegenden Arbeit steht, soll im Folgenden näher auf deren Eigenschaften, Entwicklung und Anwendungsgebiete eingegangen werden.

#### **2.4.2. Peptid-Polymer-Konjugate als spezifische Löslichkeitsvermittler**

Peptid-Polymer-Konjugate stellen eine extrem vielfältige Biohybrid-Polymerklasse dar. Durch die Kombination von Peptiden und Polymeren können sich die Eigenschaften beider Substanzklassen im entstehenden multifunktionellen Konjugat ergänzen.<sup>[121]</sup> So wurden mit dieser Art von Materialien Grundsteine für neue Ideen z. B. im Bereich der Biomineralisation, molekularen Elektronik oder in der Nanopartikel-Oberflächentechnik gelegt.<sup>[122]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden Peptid-Polymer-Konjugate als Löslichkeitsvermittler für schlecht lösliche anti-AD-Wirkstoffe eingesetzt. Im Folgenden sollen in diesem Zusammenhang Anwendungs- und Synthesemöglichkeiten der Konjugate vorgestellt werden.

Im Bereich der Materialwissenschaften konnten Peptid-PEG-Konjugate z. B. als Verträglichkeitsvermittler eingesetzt werden, wodurch die kontrollierte Organisation von Grenzflächen im Bereich der Biomaterialien erfolgen könnte.<sup>[123]</sup> Die Oberfläche von Gadoliniumoxid-Nanopartikeln konnte zudem erfolgreich durch die Peptidbindungsdomäne von Peptid-Polymer-Konjugaten funktionalisiert werden. Dies könnte für zahlreiche materialwissenschaftliche Anwendungen wie den Bereich der Beschichtungen oder Klebstoffe von Interesse sein.<sup>[124]</sup> Dichte Beschichtungen von Aluminiumoberflächen konnten ebenfalls durch Peptid-PEG-Konjugate erreicht werden. Diese nicht-kovalente „PEGylierung“ der Oberflächen erwies sich als sehr stabil und konnte ebenso gute anti-Fouling-Eigenschaften aufweisen, wie sie bei kovalent „PEGylierten“ Aluminiumoberflächen realisiert wurden.<sup>[125]</sup>

Um Peptid-Polymer-Konjugate darzustellen, wurden verschiedene Strategien zur Synthese und Funktionalisierung etabliert. Die Methoden beinhalten die folgenden Aspekte:

- Modifizierung des Peptidsegments
- Einführung chemoselektiver Gruppen am Polymersegment
- abschließende kovalente Ligation der Polymer- und Peptidsegmente.<sup>[126]</sup>

Eine Modifikation der peptidischen Einheit erfolgt meist an den Seitenfunktionalitäten der Aminosäuren Lys, Tyr oder Cys. Desweiteren können Reaktionen am  $\alpha$ -N-Terminus des



Peptids durchgeführt werden.<sup>[127]</sup> Zur selektiven Modifizierung der Aminofunktionalitäten im Peptid kann z. B. der Umstand genutzt werden, dass der  $\alpha$ -N-Terminus von Peptiden einen niedrigeren  $pK_a$ -Wert als der der  $\alpha$ -Aminogruppen in Lys aufweist.<sup>[128]</sup> Die Generierung von Amidan an der Seitenkette eines Lysins wird häufig durch die Umsetzung mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierten Carbonsäuren erreicht, während z. B. Thioether aus Cysteinen durch Maleimid-funktionalisierte Verbindungen gewonnen werden können.<sup>[129]</sup> Eine Beispielreaktion für die Alkylierung von Tyrosinresten an der phenolischen Hydroxylgruppe ist die Umsetzung tyrosinhaltiger Peptide mit durch Palladium-acetatkomplexen aktivierten Allylacetaten.<sup>[130]</sup>

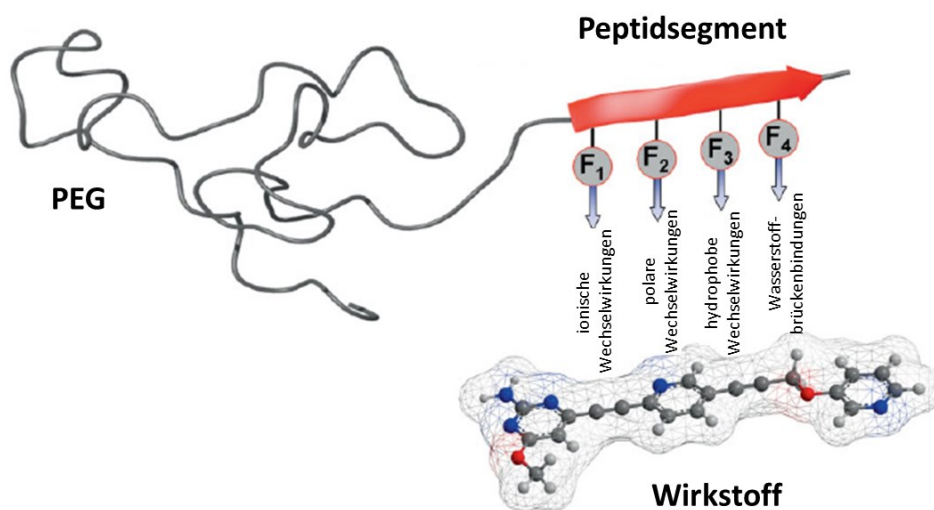
Polymere mit funktionellen Seiten- und Endgruppen und bestimmter Architektur zur Synthese von Konjugaten können z. B. über kontrollierte radikalische Polymerisationen dargestellt werden. Diese unterteilen sich in die Atomtransfer-Radikalpolymerisation (engl.: atom transfer radical polymerization, ATRP), die reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (engl.: Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer, RAFT) und die Nitroxid-vermittelte Polymerisation (engl.: Nitroxide-mediated Polymerization, NMP).<sup>[131]</sup>

Über gängige Kupplungsreaktionen werden funktionalisierte Polymere und Peptide im Anschluss kovalent miteinander verknüpft. So kann z. B. durch die Reaktion eines Amins mit einem NHS-Ester eine Amidbindung, über die Umsetzung eines Thiols mit einem Maleimid eine Thioetherbindung und über die Versetzung eines Amins mit einem Aldehyd ein sekundäres Amin generiert werden.<sup>[132]</sup> Auch Palladium-katalysierte Reaktionen wie die Heck-, Sonogashira- oder Suzuki-Reaktion kommen bei der kovalenten Kupplung zur Darstellung von Konjugaten zum Einsatz. Cycloadditionen wie die Diels-Alder-Reaktion sind ebenfalls denkbar.<sup>[126]</sup> Zur Funktionalisierung von Peptiden und Proteinen kann zudem die Staudinger-Phosphonit-Reaktion genutzt werden. Dabei werden azidhaltige Peptide oder Proteine mit Phosphonit-Derivaten umgesetzt. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Reaktions-Durchführung im wässrigen Medium und der Einsatz von Peptiden und Proteinen, die zum Teil ungeschützt vorliegen können.<sup>[133]</sup> Häufig wird auch Peptid-Festphasensynthese an Harzen durchgeführt, die bereits mit Polymeren funktionalisiert sind. Das Peptid-Polymer-Konjugat kann nach erfolgter Synthese an der oft säurelabilen Harz-Polymer-Bindung vom Harz abgespalten werden.<sup>[134]</sup>

In Bezug auf die Anwendung von Peptid-Polymer-Konjugaten ist besonders deren Anordnung im Gesamtsystem von großer Bedeutung. Dabei wird der Vorgang der spontanen Bildung geordneter Aggregate durch einzelne oder verbundene Substanzen als Selbst-Organisation bezeichnet.<sup>[135]</sup> So ist in Peptid-Polymer-Konjugaten, die cyclische Peptide enthalten, u. a. die Anordnung zu röhrenartigen Gebilden, d.h. die Ausbildung von Peptid-Polymer-Hybrid-Nanoröhren möglich.<sup>[136]</sup> Eine induzierte Selbst-Organisation von Peptid-PEG-Konjugaten ist desweiteren auch durch den Einsatz eines Enzyms realisierbar.<sup>[137]</sup> In einem Lösungsmittel, in dem sich ein Block des Konjugats löst, können sich Peptid-Polymer-Konjugate als sphärische oder zylindrische Mizellen oder Vesikel anordnen, während sie im Festkörper z. B. hexagonale, zickzackförmige Lamellen oder dünne Schichten ausbilden können. Desweiteren sind am Übergang zwischen Luft und Wasser zum Teil  $\beta$ -faltblattartige Strukturen der Konjugate nachgewiesen worden.<sup>[121]</sup>

Somit kann die Anordnung von Peptid-Polymer-Konjugaten zu geordneten Strukturen oder Aggregationsformen auf einfachem Weg gefördert werden, was vor allem den Einsatz der Hybride in der Materialwissenschaft begünstigt. Aber auch in biomedizinischen Praktiken sind vielseitige Anwendungen der Biokonjugate möglich. So erfolgte z. B. der Entwurf eines Konjugats zur gezielten Wirkstoffbindung, in dem das Polymer und der potentielle Wirkstoff über einen peptidischen Doppelwendel-Linker nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Dieses Konzept ermöglicht die einfache Bindung und Freisetzung von Wirkstoffen im Vergleich zu Wirkstoff-Transporter-Systemen mit kovalenter Bindung und könnte auch für den intrazellulären Wirkstofftransport von großem Nutzen sein.<sup>[138]</sup> Auch Mizellen aus peptidhaltigen Konjugaten kommen im Bereich der Wirkstoffverabreichung zum Einsatz. So wurden z. B. mit Cisplatin angereicherte Mizellen von Polyglutaminsäure-PEG-Konjugaten oder mit Clonazepam beladene Polybenzyl-glutamat-PEG-Mizellen synthetisiert und angewendet.<sup>[139]</sup> Für eine erhöhte Stabilität der organischen Nanotransporter wurden z. B. amphiphile Systeme wie Peptid-PEG-Konjugate entwickelt, die helikale Mizellen ausbilden und gut mit Doxorubicin beladen werden konnten. Die Wirkstoff-Transporter-Systeme zeigten gute Zirkulations-Halbwertszeiten und nur eine geringe Anreicherung in Leber und Milz.<sup>[140]</sup> Der Einsatz von Peptid-Polymer-Konjugaten in biologischen Anwendungen ist zudem sogar direkt, d.h. ohne Wirkstoffbindung möglich. Ein Beispiel hierfür sind Peptid-Polymer-Konjugate mit polyvalenten Seitenketten, die als HIV-1 Entry-Inhibitoren genutzt werden.<sup>[141]</sup> In der Gewebetechnik gibt es ebenfalls Anwendung für Peptid-Polymer-Konjugate zur Nachahmung der natürlichen Umgebung von Zellen. Durch Selbst-Organisation können die Konjugate Netzwerke ausbilden, die auf Zellsignale reagieren können.<sup>[142]</sup>

Das der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Konzept der Wirkstoffsolubilisierung nutzt Peptid-PEG-Konjugate als spezifische Löslichkeitsvermittler für schlecht wasserlösliche Wirkstoffe. Der peptidische Anteil der Biokonjugate ermöglicht die Bindung der Wirkstoffe durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, die sich zwischen den funktionellen und strukturellen Einheiten des Wirkstoffs und den Peptidseitenketten des Konjugats ausbilden. Das hochwasserlösliche PEG-Segment ermöglicht die Bildung eines wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexes und schirmt gleichzeitig den Wirkstoff gegen die Lösungsumgebung und darin enthaltene Komponenten ab (**Abb. 10**).<sup>[143]</sup> In Anwendungen der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in Biosystemen könnte diese Form der Abschirmung zudem den Umstand begünstigen, dass der Wirkstoff schlechter vom Immunsystem wahrgenommen würde. Dadurch könnten die aktiven Substanzen weniger abgebaut werden und stünden am Zielort der Anwendung in größerer Konzentration zur Verfügung.<sup>[144]</sup>



**Abb. 10.** Spezifische Solubilisierung wasserunlöslicher Wirkstoffe durch maßgeschneiderte Peptid-Polymer-Konjugate. Abgebildet mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry aus "Bioconjugates to specifically render inhibitors water-soluble" von A. K. H. Hirsch, F. Diederich, M. Antonietti, H. G. Börner, **2010**, 6, 88-91, Copyright 2010, Royal Society of Chemistry. Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc vermittelt. Abgebildet von H. G. Börner, *Macromolecular Rapid Communications*<sup>[143]</sup> mit Erlaubnis von John Wiley and Sons. Copyright 2010, John Wiley and Sons.

Die Sequenzen der Peptide konnten auf unterschiedliche Wirkstoffe maßgeschneidert werden. Um das generelle Konzept der Wirkstoffsolubilisierung durch Peptid-PEG-Konjugate zu erproben, wurden in einer ersten Studie Inhibitoren der Kinase IspE rational ausgewählt. Die synthetisierten Konjugate wiesen unterschiedliche Wasserlöslichkeiten auf und wurden mit jedem der potentiellen Wirkstoffe beladen. In Abhängigkeit von den Strukturen der Wirkstoffe und Peptidsequenzen zeigten sich geringe bis hohe Solubilisatorkapazitäten.<sup>[13b]</sup> Zahlreiche Tests bestätigten die Anwendbarkeit der wasserlöslichen IspE-Inhibitor-Konjugat-Komplexe. Die Verwendung der Kinase-IspE-Inhibitoren zielte dabei auf Biotests der Infektionskrankheiten wie Malaria oder Tuberkulose ab. Es erfolgte keine Beeinträchtigung der inhibitorischen Wirkung der untersuchten aktiven Substanzen durch die Konjugat-Solubilisierung wie durch Messung der  $IC_{50}$ -Werte in *in vitro* Biotests bewiesen wurde.<sup>[13b]</sup>

Aufgrund des Erfolges der spezifischen Solubilisierung von Wirkstoffen auf Grundlage dieser Methode wurde das Konzept anschließend für den fluoreszenten Wirkstoff *m*-THPC erweitert.<sup>[13a]</sup> Hierfür wurde ein kombinatorischer Ansatz gewählt, um Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffaffinität identifizieren zu können. Die mit *m*-THPC inkubierte Wirkstoffbibliothek wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Träger mit hoher Wirkstoffanreicherung und somit starker Fluoreszenz wurden isoliert und die auf den Trägern immobilisierten Peptidsequenzen identifiziert. Nach der Synthese einiger zugehöriger Peptid-PEG-Konjugate an PEG-funktionalisiertem Tentagel PAP-Harz (engl.: PEG-attached peptide)<sup>[134]</sup> konnten die Konjugate erfolgreich mit *m*-THPC beladen werden.<sup>[13a]</sup>

In der photodynamischen Krebstherapie zeigte das Chlorinderivat *m*-THPC vielversprechende Ergebnisse und konnte bereits bei Formen des Stachelzellkrebs an Kopf und Nacken eingesetzt werden.<sup>[145]</sup> Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs wurde jedoch vermehrt von z. B. unkontrollierter Wirkstoffverteilung in lipophilen Membranen berichtet. Herkömmliche Formulierungsadditive konnten *m*-THPC zwar solubilisieren, die Freisetzung des Wirkstoffs erfolgte jedoch sehr langsam, sodass die Krebspatienten tagelang sehr lichtempfindlich waren.<sup>[13a, 145]</sup> Mithilfe der spezifischen Solubilisierung von *m*-THPC durch Peptid-Polymer-Konjugate konnte die gezielte Freisetzung des Wirkstoffs reguliert werden, wie in einem Blutplasma-Proteinmodell gezeigt werden konnte. Die Kinetiken der Wirkstoffabgabe waren dabei stark von der Peptidsequenz der Konjugate abhängig.<sup>[13a]</sup> Auch die Länge des PEG-Anteils in den Konjugaten hatte Einfluss auf die Wirkstoffkapazitäten und Freisetzungsprofile der Additive. Die Verdopplung oder Verdreifachung des Peptidsegments der Konjugate führte ebenfalls zu unterschiedlichen Eigenschaften der Konjugate, bzw. der zugehörigen Wirkstoff-Konjugat-Komplexe.<sup>[146]</sup>

Das Konzept der Solubilisierung von *m*-THPC durch maßgeschneiderte Peptid-PEG-Konjugate wurde anschließend durch den Einbau eines zentralen, spaltbaren Cysteinrests innerhalb der Peptidsequenz erweitert. Hierdurch wurde die steuerbare, reduktive Spaltung des Peptids und die damit gleichzeitig beschleunigte Freisetzung des Wirkstoffs möglich. Dies könnte für die Aufnahme von Wirkstoffen in Zellen in Bezug auf die reduktive Zellumgebung von Bedeutung sein.<sup>[147]</sup> Um die Kapazität der Konjugate kostengünstig erhöhen zu können, wurden zusätzlich mit Palmitinsäure modifizierte Konjugate entworfen. Mit Wirkstoff:Konjugat-Verhältnissen von fast 1:1 erzielten die erweiterten Konjugate sehr hohe Wirkstoffkapazitäten.<sup>[148]</sup>

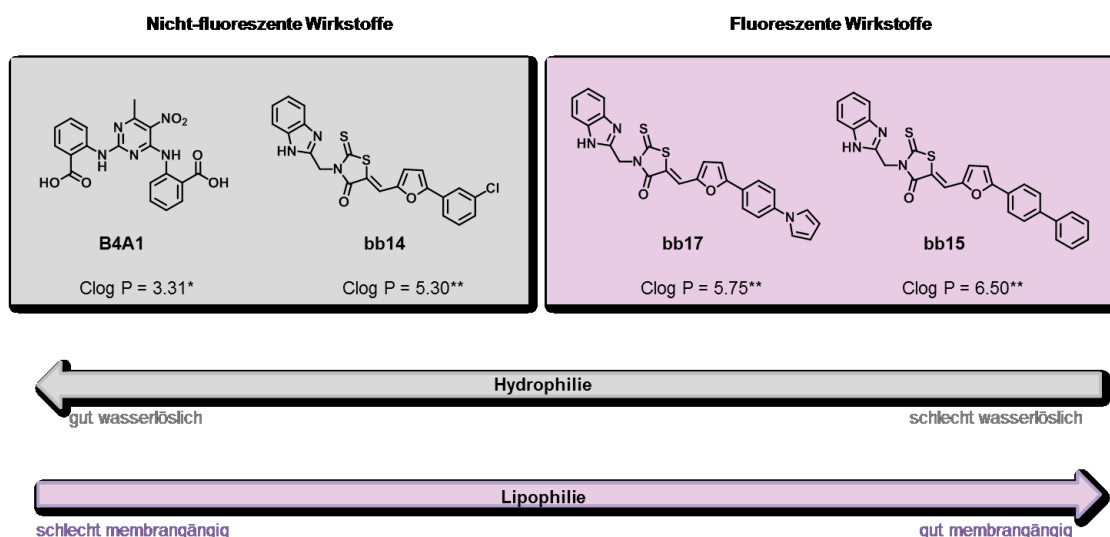
Im Folgenden sollte das Konzept auf nicht-fluoreszente Wirkstoffe ausgedehnt werden. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit potentielle anti-AD Wirkstoffe untersucht. Die Screeningprozedur sollte hierfür von der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung auf eine Raman-Mikroskopie-basierte Methode erweitert werden, um auch für nicht-fluoreszente Wirkstoffe eine Möglichkeit der spezifischen Solubilisierung durch Peptid-Polymer-Konjugate realisieren zu können.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Design wirkstoffspezifischer Peptid-Polymer-Konjugate

##### 3.1.1. Auswahlverfahren für Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffaffinität

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren vier schlecht wasserlösliche anti-AD-Wirkstoffe. Diese Wirkstoffe wurden bisher in Biotests unter Zusatz von DMSO eingesetzt und werden daher als experimentelle Wirkstoffe mit großem Potential eingestuft. Sie unterscheiden sich in Hinblick auf ihre Strukturen, Funktionalitäten und Wasserlöslichkeiten. B4A1, ein *N*-Phenylamin-Derivat, weist mit einem vorhergesagten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (ClogP) von 3.31 die höchste Wasserlöslichkeit der untersuchten Wirkstoffe auf.<sup>[66]</sup> Deutlich weniger löslich sind die Substanzen bb14, bb17 und bb15, der Klasse der Rhodanine zugehörig, mit ClogP-Werten von 5.30, 5.75 und 6.50 (**Abb.11**).<sup>[1a]</sup> In dieser Reihenfolge, d.h. mit zunehmender Hydrophobie, wurden die vier Wirkstoffe in der vorliegenden Arbeit untersucht.

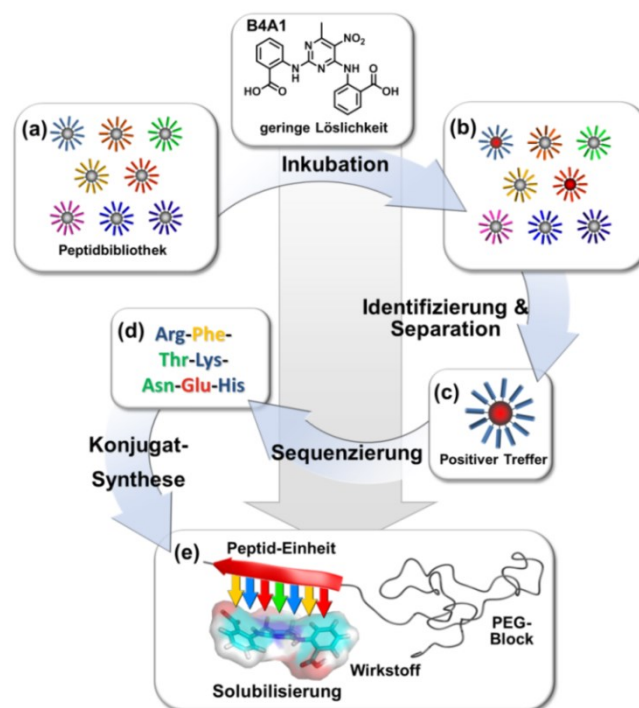


**Abb. 11.** Überblick der zu untersuchenden potentiellen anti-AD-Wirkstoffe B4A1, bb14, bb17 und bb15. Die ClogP-Werte der Substanzen wurden entnommen aus <sup>[149]</sup>(\*) und <sup>[1a]</sup>(\*\*).

Um die Bioverfügbarkeit der Substanzen in wässrigen Systemen zu verbessern, sollten Peptid-Polymer-Konjugate als maßgeschneiderte Solubilisatoren entwickelt werden, die den Wirkstoff spezifisch über das Peptidsegment binden, sodass es zur Ausbildung eines wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexes kommt. Diese Komplexe sollten in Hinblick auf ihre Wirkstoff:Konjugat-Verhältnisse, Größe und Form der Wirkstoffbindung charakterisiert werden. In zellfreien und Zell-Biotests der Tau-Protein-Aggregation sollte die Prüfung des Einflusses der Wirkstoff-Konjugat-Transportform auf die Bioverfügbarkeit und Wirkstoffaktivität erfolgen. Auch die Fähigkeit der Komplexe bezüglich der Deaggregation bereits gebildeter Tau-Aggregate sollte untersucht werden. Durch die erhöhte

Wasserlöslichkeit und somit Verfügbarkeit könnte die Konzentration an Wirkstoff in den Zellen im Vergleich zu herkömmlichen Tests deutlich erhöht werden. In den bereits etablierten Zelltests ohne Solubilisator wurden die schwer wasserlöslichen Inhibitoren bisher unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

Um für die Solubilisierung geeignete Peptide identifizieren zu können, wurden große Peptidbibliotheken auf ihre Anreicherung mit den potentiellen Wirkstoffen untersucht. Dazu wurden für die jeweilige Substanz festphasengebundene Peptidbibliotheken mit dem Wirkstoff inkubiert und die Anreicherung des Wirkstoffs an einzelnen Trägern verfolgt (**Abb. 12** am Beispiel von B4A1). Im Fall von B4A1 und bb14, die keine, bzw.- nur eine schwache Eigenfluoreszenz aufwiesen, erfolgte die Identifikation von Trägern mit besonders hoher Substanzanreicherung mittels Raman-Mikroskopie. Die Verfolgung der Anreicherung der Wirkstoffe bb17 und bb15 an einzelnen Trägern der Bibliothek erfolgte aufgrund ihrer Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. Positive Treffer wurden anschließend isoliert, die Peptide von den Trägern abgespalten und die Peptidsequenzen massenspektroskopisch identifiziert. Vielversprechende Peptidsequenzen wurden als zugehörige Peptid-PEG-Konjugate synthetisiert, mit dem jeweiligen potentiellen Wirkstoffen beladen und die wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in weiterführenden Anwendungen untersucht. Text wurde aus [8b, 8c] angepasst.



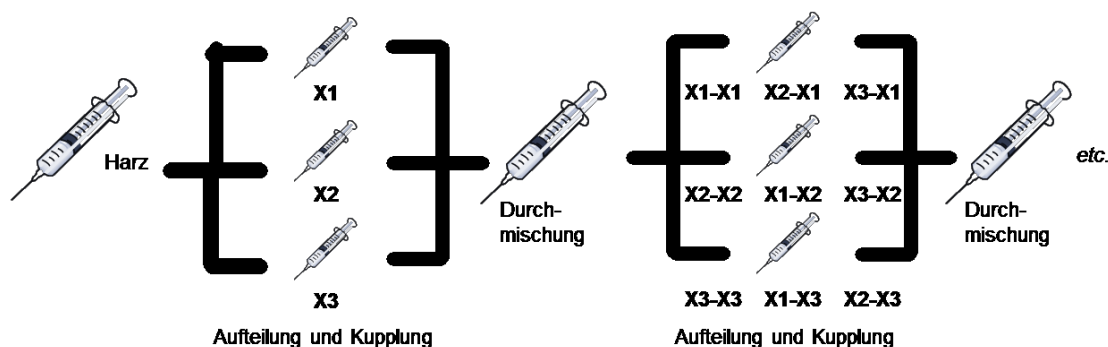
**Abb. 12.** Darstellung zum Verfahren der Entwicklung spezifischer Löslichkeitsvermittler am Beispiel von B4A1, einem potentiellen Raman-aktivem Wirkstoff: (a) Inkubation einer Peptidbibliothek mit dem potentiellen Wirkstoff B4A1. (b) Anreicherung der Substanz an Trägern von Peptiden mit hoher Wirkstoffkapazität. (c) Positive Treffer wurden mittels Raman-Mikroskopie identifiziert und anschließend separiert. (d) Die Peptide wurden von der Festphase abgespalten und massenspektroskopisch sequenziert. (e) Abschließend erfolgte die Synthese der zugehörigen Peptid-Polymer-Konjugate, die mit dem Wirkstoff beladen wasserlösliche Komplexe bildeten. [8b, 8c]

#### 3.1.2. Erstellung und Synthese wirkstoffspezifischer Peptidbibliotheken

Zur Identifikation von Peptidsequenzen mit hoher Affinität zu den potentiellen Wirkstoffen erfolgte zunächst die Synthese maßgeschneiderter Heptapeptidbibliotheken. Die Auswahl der sieben verschiedenen, in den Bibliotheken enthaltenen Aminosäuren richtete sich nach den Wirkstoffstrukturen, um ein möglichst großes Spektrum verschiedener Wechselwirkungen zwischen den Wirkstoffen und den funktionellen Seitengruppen der Peptide zu ermöglichen. Aufgrund des Kompromisses zwischen guter Handhabbarkeit der Bibliotheksgröße im Labormaßstab und der für Wirkstoff-Peptid-Interaktionen ausreichenden Anzahl an Funktionalitäten wurden Heptapeptidbibliotheken gewählt. Die Darstellung erfolgte mithilfe der *Split-und-Mix-Synthese* (**Abb. 13a**)<sup>[150]</sup> auf Grundlage der festphasengebundenen Peptidsynthese<sup>[113]</sup> nach der Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Strategie.<sup>[151]</sup>

Als Festphase wurde das ChemMatrix® Harz<sup>[152]</sup> gewählt, da es in Wasser sehr stark aufquillt. Die anschließend ca. 200 µM großen Festphasen können manuell mit einer Mikropipette isoliert werden – eine notwendige Voraussetzung für die Screeningprozedur. Zudem weist das ChemMatrix® Harz eine hohe Stabilität den Synthese- und Screening-Bedingungen gegenüber auf, da die enthaltenen PEG-Ketten über Vinylgruppen kreuzvernetzt sind.<sup>[152]</sup> Zwischen die Festphase und die jeweilige Peptidsequenz wurde zunächst ein Gly-Gly-Met-Segment eingefügt (**Abb. 13b**).<sup>[13a]</sup> Da Methionin auf einfachem Weg chemisch durch Bromcyan gespalten werden kann, war die Sequenzierung der Peptide somit gewährleistet. Zudem ist die Abspaltung des Peptids auf diese Weise unabhängig von der verwendeten Schutzgruppen-Methode der Bibliothekssynthese möglich. Während Fmoc als basenlabile Schutzgruppe eingesetzt wurde und die Seitenschutzgruppen der Aminosäuren wie Trityl (Trt) oder *tert*-Butyl (*t*-Bu) unter sauren Bedingungen abgespalten wurden, bleibt das Gly-Gly-Met-Segment unter diesen Bedingungen stabil. Die Gly-Gly-Einheit diente zum einen als Abstandhalter zwischen der Spaltungsstelle am Met und der Peptideinheit. Zum anderen erleichterte sie durch Erhöhung der Gesamtmasse des Peptides dessen spätere Sequenzierung. Da Gly nicht über funktionelle Seitengruppen verfügt, wurden durch Einbau des Gly-Gly-Segments die Wechselwirkungen zwischen der variablen Peptidsequenz und den Wirkstoffen vorraussichtlich nur geringfügig beeinflusst.

Um eine Peptidbibliotheksgröße von  $7^7$  (ca. 823 000) verschiedenen immobilisierten Peptiden zu erhalten, wurde die vorbehandelte Festphase zunächst in sieben Aliquote aufgeteilt (engl.: split). An jedes der Aliquote wurde eine der ausgewählten sieben Fmoc-Aminosäure-Derivate gekuppelt und anschließend alle Aliquote durchmischt (engl.: mix). Im Anschluss an die Acetylierung und *N*-terminale Fmoc-Entschützung erfolgte eine erneute Aufteilung der Festphasen in sieben Aliquote, sodass der Vorgang ein weiteres Mal durchgeführt werden konnte. Nach sechsfacher Wiederholung dieser Prozedur lag die Gesamtpeptidbibliothek vor, wobei jede Festphase multiple Kopien eines Peptidsegments trug. Die Prozedur wurde in **Abb. 13a** schematisch für eine Bibliothek aus Dipeptiden dargestellt.<sup>[13a]</sup>

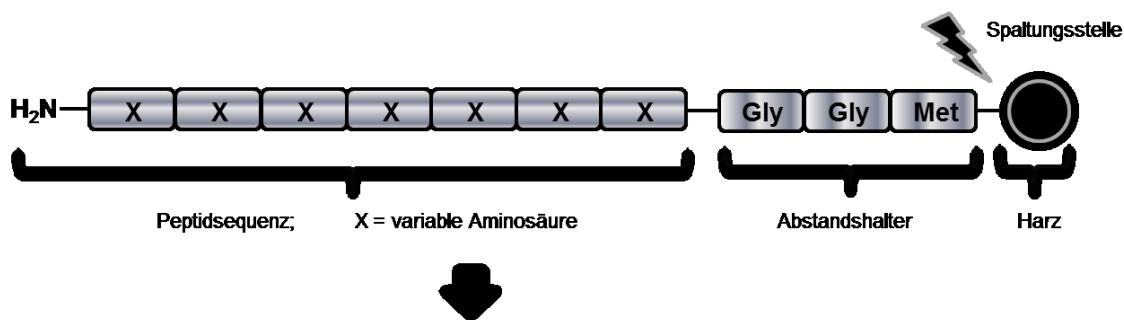


**Abb. 13a.** *Split-und-Mix-Methode* zur Erstellung von Peptidbibliotheken: Aufteilung der Festphase in eine beliebige Anzahl von Aliquots, Kupplung jedes Aliquots mit je einer Aminosäure, Durchmischung der Aliquots gefolgt von erneuter Aufteilung und Kupplung von je einer Aminosäure an ein Aliquot. Die Anzahl der Wiederholungen dieses Vorgangs entsprach der Zahl der verschiedenen eingesetzten Aminosäuren.

Um die Ausbildung möglichst vieler und vielfältiger Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen zu gewährleisten, wurden die sieben in den Bibliotheken enthaltenen Aminosäuren in Hinblick auf ihre Eigenschaften und die Struktur der zu untersuchenden Wirkstoffe eingesetzt. B4A1, ein *N*-Phenylamin mit zwei Carboxylgruppen, sollte in erster Linie hydrophobe und ionische Wechselwirkungen mit einem Peptid eingehen können. Daher wurde eine Peptidbibliothek mit den drei basischen Aminosäuren L-Arg, L-Lys und L-His gewählt, um beurteilen zu können, inwiefern die verschiedenen Basizitäten in der Ausbildung ionischer Wechselwirkungen mit B4A1 eine Rolle spielen. L-Glu wurde eingesetzt, um das Prinzip der spezifischen Wechselwirkungen nachweisen zu können, da Säure-Säure-Interaktionen zwischen den Carboxylfunktionen von B4A1 und Glu nicht zu erwarten waren. Für  $\pi\pi$ - und van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den phenylischen Einheiten von B4A1 wurde L-Phe eingebaut und die Aminosäuren L-Thr und L-Asn für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und polaren Wechselwirkungen mit den Aminen und der Pyrimidineinheit von B4A1 (**Abb. 13b**).<sup>[8b, 8c]</sup>

Die Rhodanine bb14, bb17 und bb15 unterscheiden sich strukturell von B4A1, da sie nur aromatische Segmente und polare Funktionalitäten aufweisen. Für diese Substanzen kamen hauptsächlich hydrophobe und polare Wechselwirkungen in Frage. Deshalb wurden die Rhodanine mit einer Peptidbibliothek, synthetisiert von S. Wieczorek, untersucht, die zwei unpolare Aminosäuren L-Phe und L-Leu statt nur L-Phe wie in der B4A1-Bibliothek aufwies. Auf diese Weise sollte beurteilt werden, ob die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Peptid und Wirkstoff vorwiegend aromatischer oder aliphatischer Natur waren. Für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und polaren Wechselwirkungen wurden L-Gln und L-Ser eingesetzt. Um den Peptiden zusätzliche konformationelle Flexibilität zu ermöglichen, wurde zusätzlich Gly gewählt, das zwar keine funktionellen Seitengruppen aufweist, dafür aber als Abstandshalter im Peptid dienen konnte. Ionische Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen waren aufgrund der nicht-ionischen Strukturen von bb14, bb17 und bb15 eher nicht zu erwarten. Dennoch wurden die Aminosäuren L-Lys und L-Glu für derartige Wechselwirkungen aufgenommen, um im Screening mindestens einen Aminosäure-Vertreter jeder Wechselwirkungsklasse abzudecken (**Abb. 13b**).<sup>Text wurde aus [153] angepasst.</sup>





**Variable Aminosäuren X für das Screening der Wirkstoffe B4A1, bb14, bb17 und bb15**

Wirkstoff	unpolare Aminosäuren	polare Aminosäuren	Basische Aminosäuren			Saure Aminosäuren	Neutrale Aminosäuren
B4A1	F	N T	K	R	H	E	
bb14, bb17, bb15	F L	Q S	K			E	G

**Abb. 13b.** Die dargestellten Peptidbibliotheken bestanden aus Festphasen mit je einem variablen Heptapeptidsegment, das durch ein spaltbares Gly-Gly-Met-Segment von der Festphase getrennt war. Für den Wirkstoff B4A1 erfolgte die Synthese einer Peptidbibliothek mit den Aminosäuren R, K, H, F, N, T, E. Zur Untersuchung der Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15 wurde eine Bibliothek, synthetisiert von S. Wieczorek, verwendet.<sup>[13a]</sup>

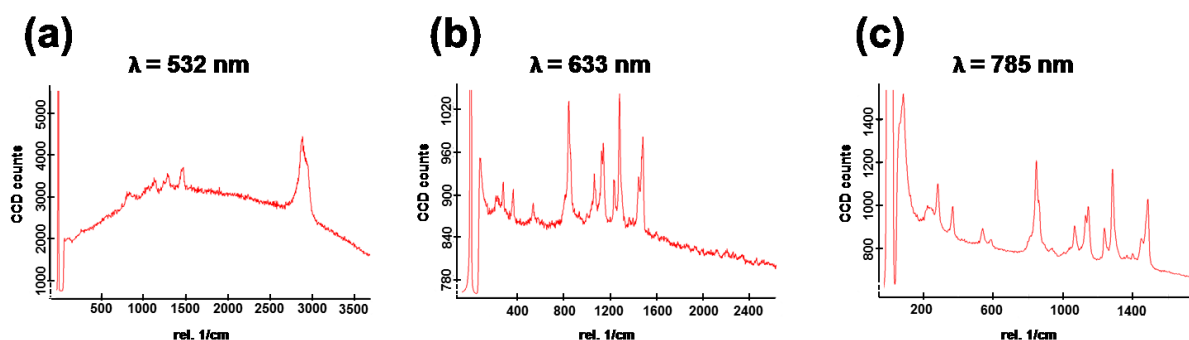
### 3.1.3. Anreicherung der Wirkstoffe an spezifischen Trägern der Peptidbibliotheken

Zur Anreicherung der Wirkstoffe an peptidischen Trägern der Bibliotheken mit hoher Wirkstoffkapazität wurden die vollständig entschützten Bibliotheken mit den Wirkstoffen über Nacht versetzt. Die Inkubation erfolgte mit einer 2.7 mM (B4A1), 2.5 mM (bb14), 2.3 mM (bb17) und 2.3 mM (bb15) Mischung von DMSO/Wasser (4:5 V/V), in der sich die Wirkstoffe nur schlecht lösten, aber ein hinreichend hoher gelöster Wirkstoffanteil für die zügige Verteilung zur Verfügung stand. Auf diese Weise erfolgte eine beschleunigte Anreicherung der Substanzen an den Bibliotheksträgern. Um Harzkugeln mit hoher Wirkstoffanreicherung identifizieren zu können, wurden die inkubierten Festphasen zunächst gewaschen. Die mit B4A1 oder bb14 inkubierten Träger wurden für die Untersuchung mit Raman-Mikroskopie zusätzlich mit Wasser gewaschen, da DMSO starke Raman-Signale aufweist, die die Messungen überlagern würden. Die gesäuberten Harzkugeln wurden auf einem Glasobjektträger an der Luft getrocknet.<sup>[8b, 8c]</sup> Mit bb17 oder bb15 inkubierte Festphasen wurden in wässriger Lösung in eine Petrischale gefüllt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.<sup>[153]</sup>

### 3.1.4. Identifikation von Bibliotheksträgern mit hoher Wirkstoffanreicherung durch Raman-Mikroskopie

#### N-Phenylamin B4A1

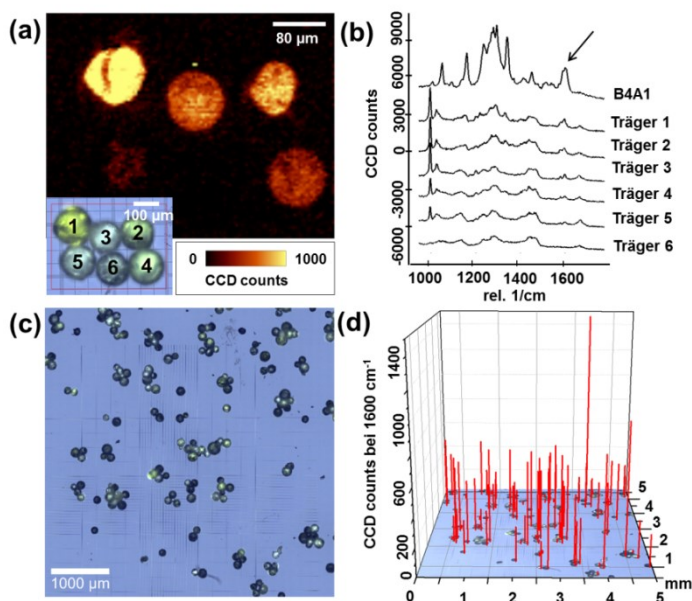
Für die Raman-analytische Untersuchung der inkubierten Peptidbibliothek zur Identifikation wirkstoffaffiner Peptidsequenzen erfolgte zunächst die Auswahl eines Lasers mit geeigneter Anregungswellenlänge. Zur Verfügung standen Laser mit den Wellenlängen 532 nm, 633 nm und 785 nm. Für aussagekräftige Raman-Messungen war vor allem entscheidend, dass bei den Messungen möglichst keine Autofluoreszenz der zu untersuchenden Stoffe auftrat, die die Raman-Signale überlagern würde. Besonders aromatische, organische Proben neigen unter Anregung von Licht im sichtbaren Bereich häufig zur Autofluoreszenz. Diese Problematik zeigte sich auch hier bei den Raman-Messungen der Bibliotheks-Festphase ChemMatrix<sup>®</sup> Harz mit den Lasern der Anregungswellenlängen  $\lambda = 532$  nm und  $\lambda = 633$  nm (**Abb. 14a,b**).<sup>[154]</sup> Die Fluoreszenz-Untergrundsignale von Proben können jedoch durch eine geeignete Anregungswellenlänge minimiert werden.<sup>[154-155]</sup> In diesem Fall erwies sich die Verwendung eines  $\lambda = 785$  nm Lasers als vorteilhaft, da mit einer Anregungswellenlänge im nahem Infrarotlicht kaum Autofluoreszenz-Signale auftraten. Zudem wurde mit diesem Laser das beste Signal-Rausch-Verhältnis erzielt (**Abb. 14c**).



**Abb. 14.** Raman-Spektren der Bibliotheks-Festphase ChemMatrix<sup>®</sup> Harz. Die Messungen erfolgten mithilfe von Lasern unterschiedlicher Anregungswellenlängen. (Bedingungen: (a)  $\lambda = 532$  nm, Leistung = 27 mW hinter dem Objektiv, 10 x 0.6 s Messzeit; (b)  $\lambda = 633$  nm, Leistung = 24 mW hinter dem Objektiv, 10 x 2.0 s Messzeit; (c)  $\lambda = 785$  nm, Leistung = 74 mW hinter dem Objektiv, 10 x 2.0 s Messzeit).

Für die Identifikation von Peptiden mit hoher Affinität zu B4A1 musste zunächst ein für B4A1 charakteristisches Raman-Signal auf den einzelnen Bibliotheksträgern quantitativ nachgewiesen werden. Bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  zeigte das Raman-Spektrum von B4A1 (**Abb. 15b**) eine intensive Vibrationsbande, die hervorragend als Referenzsignal genutzt und der asymmetrischen CC-Streckschwingung des aromatischen Ringsystems von B4A1 zugeordnet werden konnte.<sup>[156]</sup> Der spektroskopische Nachweis verschieden hoher Konzentrationen von B4A1 auf unterschiedlichen Bibliotheksträgern gelang durch die Aufnahme eines hochauflösenden Raman-Scans (**Abb. 15a**). Dazu wurde zunächst von sechs annähernd gleich großen, mit B4A1 inkubierten Trägern, ein optisches Mikroskopbild aufgenommen (**Abb. 15a Einschub**). Die Raman-Messung erfolgte anschließend mit Fokus

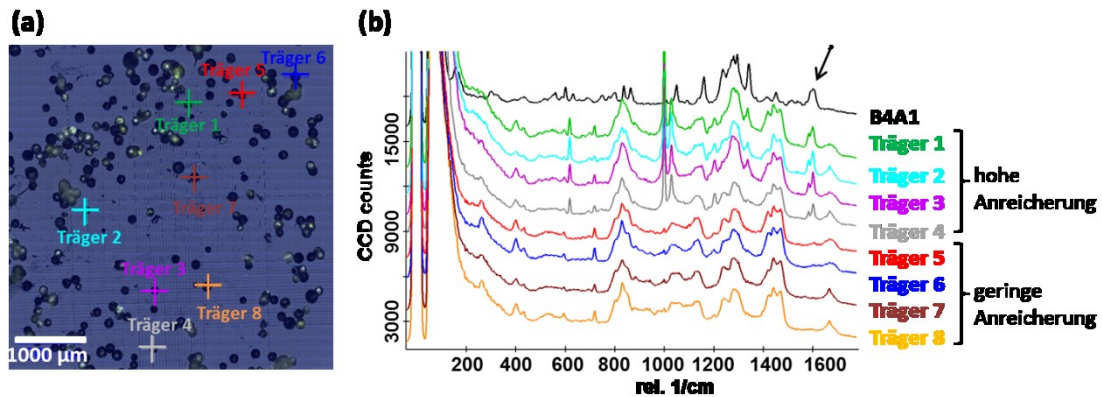
auf den Kugeloberflächen. Um die verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zu visualisieren, erfolgte die Integration der CCD counts im B4A1-spezifischen Peakbereich von 1595-1605  $\text{cm}^{-1}$  und die Umwandlung der Integrale in ein Intensitäts-Falschfarbenbild (**Abb. 15a**). Aufgrund der Charakteristik dieses Peakbereichs für B4A1 konnte deutlich zwischen Trägern mit sehr hoher (**Abb. 15a,b Träger 1**), mittlerer (**Abb. 15a,b Träger 2-4**) und geringer Wirkstoffanreicherung (**Abb. 15a,b Träger 4 und 5**) unterschieden werden.



**Abb. 15.** Screeningverfahren zur Identifizierung von Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffanreicherung: Untersuchung von mit B4A1 inkubierten Bibliotheksträgern mittels Raman-Mikroskopie. (a) Hochaufgelöster Raman-Scan mit optischem Mikroskopbild von sechs nahezu gleichgroßen Trägern, die hohe bis niedrige Raman-Signale im Bereich um 1600  $\text{cm}^{-1}$  zeigten, (b) charakteristisch für die asymmetrischen CC-Streckschwingung des aromatischen Ringsystems von B4A1. (c) Zur Positionsbestimmung der inkubierten Bibliotheksträger wurden diese auf einem Glasträger präpariert und durch optische Mikroskopie vermessen. (d) Visualisierung der Intensitätshöhe der gemessenen CCD counts bei 1600  $\text{cm}^{-1}$  für die in (c) abgebildeten Bibliotheksträger, gemessen mit der *Auto-Focus-Single-Spectrum*-Methode zur Verringerung der Messzeit. (Bedingungen: (a,b)  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , Leistung = 74 mW hinter dem Objektiv, 1 x 2.0 s Messzeit); (c,d)  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , Leistung = 74 mW hinter dem Objektiv, 2 x 2.0 s Messzeit).<sup>[8b, 8c]</sup>

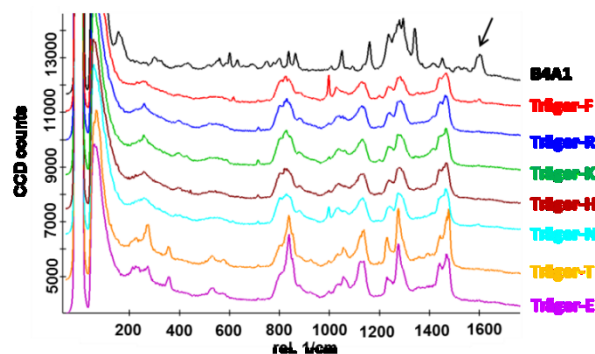
Um die Messzeit zu reduzieren und die Vergleichbarkeit der Raman-Intensitäten der Banden auch zwischen verschiedenen großen Kugeln gewährleisten zu können, erfolgte die Analyse einer größeren Anzahl von Festphasen mit der *Auto-Focus*-Methode. Dazu wurde zunächst ein optisches Bild einer 5000 x 5000  $\mu\text{m}$  großen Fläche aufgenommen, um die Position möglichst vieler Träger festlegen zu können (**Abb. 15c**; **Abb. 16a**). Auf jedem der Träger wurde nach Einlesen der Trägerpositionen automatisch nur ein Raman-Spektrum mit der Methode *Auto-Focus-Single-Spectrum* in der Mitte des Trägers und gleichzeitig im Fokus des Trägers aufgenommen. Die Höhe der Peakintensität bei 1600  $\text{cm}^{-1}$ , die charakteristisch für den B4A1-Gehalt auf dem Träger ist, wurde von allen Trägern verglichen (**Abb. 15d**, **Abb. 16b**). Träger, die einen Intensitätswert von > 1000 CCD counts zeigten, wurden als positive Treffer bewertet und weiter analysiert (**Abb. 16b**, **Träger 1-4**). Beispiele für

Bibliothekspartikel, die keine B4A1-Anreicherung zeigten, wurden in **Abb. 16b** als **Träger 5-8** abgebildet. Vor jeder Messung wurde der Fokus automatisch optimiert (*Auto-Focus*), weshalb die Peakintensitäten aller Träger miteinander verglichen werden konnten. Die Methode *Auto-Focus* erfolgte über die schnelle Maximierung eines intensiven Raman-Peaks von B4A1 bei  $51 - 59 \text{ cm}^{-1}$ , der nicht von einem Raman-Signal des Trägerharzes überlagert wurde. In einem Bereich von  $200 \mu\text{m}$  wurde das Maximum dieses Raman-Signals ermittelt und auf dieser Höhe das Raman-Spektrum für den Träger aufgenommen (**Abb. 16b**).



**Abb. 16.** (a) Optisches Mikroskopbild von mit B4A1 inkubierten Bibliothekspartikeln auf einem Glasträger. (b) Raman-Spektren von ausgewählten Trägern (siehe a) mit hoher und geringer Anreicherung des potentiellen Wirkstoffs B4A1. (Bedingungen:  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , Leistung =  $74 \text{ mW}$  hinter dem Objektiv,  $2 \times 2.0 \text{ s}$  Messzeit).<sup>[8b, 8c]</sup>

Raman-Spektren der einzelnen Aminosäuren der Bibliothek wurden ebenfalls gemessen, um eine Überlagerung des für B4A1 charakteristischen Signals bei  $1600 \text{ cm}^{-1}$  durch Signale der Aminosäuren ausschließen zu können (**Abb. 17**). Lediglich Phenylalanin zeigte bei der gleichen Laserintensität ein Raman-Signal von 238 CCD counts bei  $1600 \text{ cm}^{-1}$ . Dies stellte eine deutlich geringere Intensität des Raman-Signals dar als die der ausgewählten Träger mit hoher Wirkstoffanreicherung, die mindestens 1000 CCD counts aufwiesen.



**Abb. 17.** Raman-Spektren der auf dem Trägerharz immobilisierten Homopeptide der in der Bibliothek verwendeten Aminosäuren Phe, Arg, Lys, His, Asn, Thr und Glu. (Bedingungen:  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , Leistung =  $74 \text{ mW}$  hinter dem Objektiv,  $2 \times 2.0 \text{ s}$  Messzeit).<sup>[8b]</sup>

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt wurden im B4A1-Screening 265 inkubierte Bibliotheks-Festphasen ramanmikroskopisch untersucht. 44 der Träger ( $\pm 17\%$ ) zeigten eine hohe Wirkstoffanreicherung. Mithilfe von MALDI-MS/MS konnten durch Sequenzierung der von der Festphase abgespaltenen Peptide 30 Peptidsequenzen mit potentieller Kapazität zu B4A1 ermittelt werden (Tab. 1).<sup>[8b, 8c]</sup>

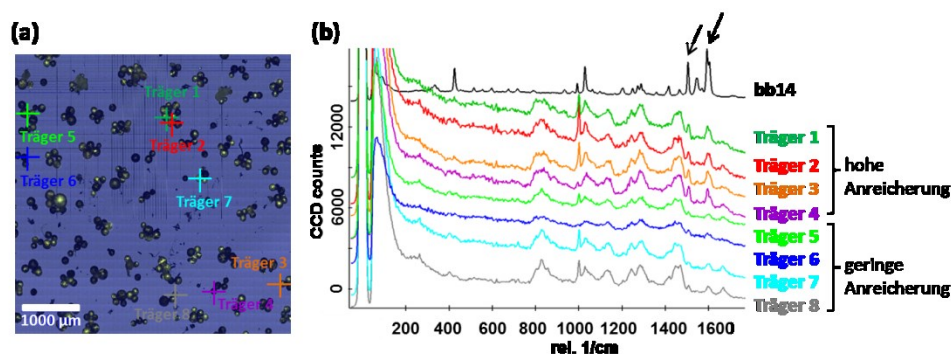
**Tab. 1.** MS/MS-Analyseergebnisse der identifizierten und isolierten Bibliotheksträger mit hoher Anreicherung an B4A1. Die Peptide wurden vor der Analyse vom Harz abgepalten. Pos = Position innerhalb der Peptidsequenz. Der Ion Score ergab sich aus dem Vergleich der Peaks der MS/MS-Spektren mit der Datenbank, die alle theoretisch möglichen Peptidsequenzen der Bibliothek enthielt. Die Anzahl der Massen der Fragmentionen entsprach dem Ion Score, der demnach Peptidsequenzen angab, die am besten mit den experimentellen Daten übereinstimmten.<sup>[8b, 8c, 157]</sup>

	NH <sub>2</sub> -Pos1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion Score	Konjugat-synthese
1	H	F	E	F	T	N	H	91	
2	F	F	T	K	F	K	H	82	
3	T	H	H	N	N	F	F	78	
4	H	F	T	H	F	H	N	75	
5	E	E	E	K	H	F	F	73	
6	N	R	T	T	F	F	H	59	
7	T	F	E	R	T	F	K	58	
8	K	H	H	F	H	N	R	53	
9	E	H	R	E	F	T	F	53	
10	F	F	H	H	K	K	K	53	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG
11	N	R	K	N	F	F	H	52	
12	K	T	R	K	K	F	F	50	
13	H	H	F	K	F	H	R	48	
14	F	R	K	H	K	H	F	48	
15	E	F	R	R	F	R	H	47	
16	F	R	N	H	F	E	F	47	
17	E	E	R	F	T	R	E	46	
18	R	K	H	F	N	T	F	46	Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG
19	N	F	T	K	H	H	H	46	
20	K	K	T	F	H	R	F	45	
21	F	R	H	K	K	F	N	44	Pep <sub>3</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG
22	N	H	F	T	R	N	H	43	
23	K	R	T	K	F	N	F	40	
24	K	R	K	R	E	R	F	38	
25	R	K	R	T	K	F	H	36	
26	K	K	F	E	F	N	N	35	
27	R	F	K	H	T	K	E	35	
28	R	H	F	H	K	H	R	33	
29	F	R	K	R	F	N	T	26	
30	R	K	R	F	R	R	H	22	

Farbcode: Aromatisch/hydrophob: gelb; anionisch/polar: blau; kationisch/polar: rot; polar: grün.

## Rhodanin bb14

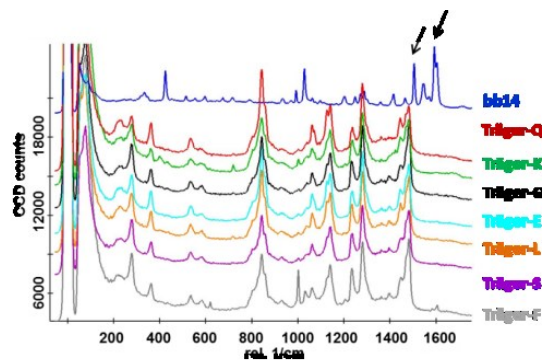
Zur Bestätigung des mit B4A1 entwickelten Grundkonzepts zur Auffindung wirkstoffaffiner Peptidsequenzen mithilfe Raman-spektroskopischer Untersuchungen von Peptidbibliotheken wurde der potentielle Wirkstoff bb14 ebenfalls mit der *Auto-Focus-Single-Spectrum* Methode untersucht. Auf den inkubierten Trägern wurde automatisch auf jeder Kugel nach Aufnahme eines optischen Mikroskopbilds (**Abb. 18a**) ein Raman-Spektrum unter Verwendung des  $\lambda = 785 \text{ nm}$  Lasers aufgenommen. Der *Auto-Focus* wurde in einem Höhenintervall von  $300 \mu\text{m}$  und einem Peakbereich von  $51 - 59 \text{ cm}^{-1}$  gesucht, da dort wie bei B4A1 eine intensive Bande auftrat, die nicht von den Raman-Signalen des Harzes überlagert wurde. Die gemessenen Raman-Spektren wurden bezüglich der Intensität an CCD counts bei den für bb14 spezifischen Signalen bei  $1508 \text{ cm}^{-1}$  und  $1595 \text{ cm}^{-1}$  verglichen. Als Grenze für Träger mit bb14-affinen Peptidsequenzen wurden Raman-Spektren mit mehr als 940 CCD counts bei  $1508 \text{ cm}^{-1}$  und mehr als 1200 CCD counts bei  $1595 \text{ cm}^{-1}$  ausgewählt (**Abb. 18b, Träger 1-4**). Bibliothekspartikel, die keine oder eine nur geringe Anreicherung an bb14 aufwiesen, wurden in **Abb. 18b** als **Träger 5-8** dargestellt.



**Abb. 18.** (a) Mit bb14 inkubierte Bibliothekspartikel auf einer Glasträgeroberfläche. Optisches Mikroskopbild zur Festlegung der Trägerpositionen. (b) Darstellung hoher und geringer bb14-spezifischer Raman-Signale als Maß für die Anreicherung des Wirkstoffs an Bibliotheksträgern. (Bedingungen:  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , Leistung =  $74 \text{ mW}$  hinter dem Objektiv,  $2 \times 2.0 \text{ s}$  Messzeit).<sup>[8b, 8c]</sup>

Die Kontroll-Raman-Spektren der einzelnen in der Bibliothek verwendeten Aminosäuren wurden ebenfalls aufgenommen. Es war keine Überlagerung der Aminosäuresignale mit den bb14-spezifischen Raman-Bereichen erkennbar (**Abb. 19**).





**Abb. 19.** Abbildung der Kontroll-Raman-Spektren von bb14 und den untersuchten Aminosäuren Gln, Lys, Gly, Glu, Leu, Ser und Phe, immobilisiert auf der Festphase. (Bedingungen:  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , Leistung = 74 mW hinter dem Objektiv, 2 x 2.0 s Messzeit).<sup>[8b]</sup>

Von 352 erfolgten Messungen wurden 41 als positive bewertete Träger ( $\pm 12\%$ ) identifiziert und mittels Sequenzierung der Peptide über MALDI-MS/MS 22 verschiedene Peptidsequenzen ermittelt (**Tab. 2**).<sup>[8b]</sup>

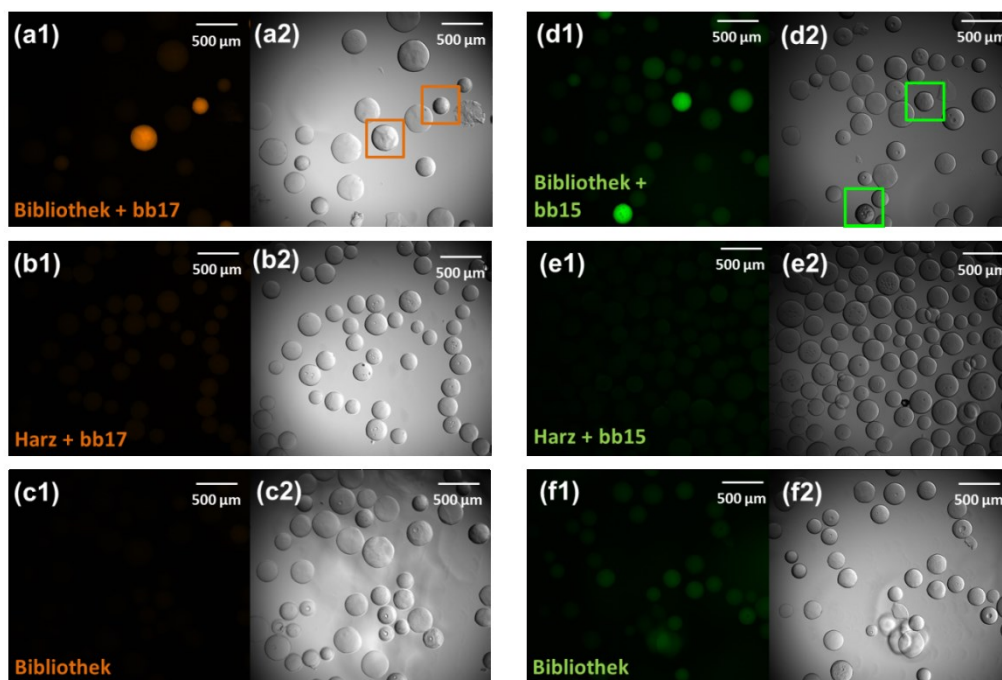
**Tab. 2.** Ermittelte Peptidsequenzen des bb14-Screenings. Die Auswertung erfolgte mittels MALDI-MS/MS nach Abspaltung der Peptide vom Trägerharz. Pos = Position innerhalb der Peptidsequenz.<sup>[8b, 8c]</sup>

	NH <sub>2</sub> -Pos1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion Score	Konjugat-synthese
1	G	F	Q	Q	S	G	F	83	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG
2	G	Q	Q	F	Q	L	S	81	
3	S	E	F	Q	E	Q	L	75	
4	S	S	S	F	F	F	G	74	
5	S	F	F	Q	G	G	L	69	Pep <sub>2</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG
6	G	G	K	L	F	Q	F	64	
7	S	S	F	Q	E	Q	Q	61	
8	E	Q	E	S	F	G	S	59	
9	Q	S	K	G	F	E	S	54	
10	S	L	F	F	Q	S	L	38	Pep <sub>3</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG
11	E	Q	L	Q	Q	S	S	36	
12	G	L	G	S	Q	Q	Q	33	
13	S	F	F	Q	L	Q	Q	33	
14	G	Q	F	L	L	Q	F	31	
15	S	E	S	E	E	S	E	31	
16	Q	F	E	S	L	S	L	31	
17	E	E	S	E	Q	S	F	30	
18	G	Q	G	Q	E	Q	S	28	
19	G	L	E	Q	Q	Q	Q	26	
20	E	E	S	E	F	S	S	25	
21	G	G	S	S	L	E	S	20	
22	G	Q	Q	F	Q	L	S	19	

Farbcode: Aromatisch/hydrophob: gelb; anionisch/polar: blau; kationisch/polar: rot; polar: grün.

### 3.1.5. Identifikation von Bibliotheksträgern mit hoher Wirkstoffanreicherung durch Fluoreszenz-Mikroskopie

Da die potentiellen Wirkstoffe bb17 und bb15 fluoreszente Substanzen darstellen, konnte die Identifikation von Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffanreicherung nicht mittels Raman-Mikroskopie erfolgen, weil die Raman-Signale durch die wesentlich stärkeren Fluoreszenz-Signale überlagert werden würden. Sie wurden daher mit dem bereits etablierten Screeningverfahren der Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.<sup>[13a]</sup> Die mit bb17 oder bb15 inkubierten Bibliotheksträger wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop und Anregungswellenlängen von 550 nm, bzw. 470 nm untersucht. Bei diesen Wellenlängen konnten Träger mit hoher Wirkstoffanreicherung spezifisch detektiert werden (**Abb. 20a1,d1**). Referenzmessungen mit bb17, bzw. bb15 inkubierten Harzträgern ohne Peptidsequenzen zeigten bei 550 nm, bzw. 470 nm wie gewünscht keine Fluoreszenz (**Abb. 20b1,e1**). Auch die uninkubierten Bibliothekspartikel wiesen keine (**Abb. 20c1**), bzw. eine gleichmäßige, schwache Fluoreszenz (**Abb. 20f1**) auf. Dies verdeutlichte, dass stark leuchtende Bibliotheksträger tatsächlich die Bindung der fluoreszenten, potentiellen Wirkstoffe an die Peptide der Bibliothek darstellten und somit die Isolierung dieser positiven Treffer Partikel hervorbringen sollte, die eine hohe Wirkstoffkapazität aufwiesen.



**Abb. 20.** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit bb17 (a,b,c) und bb15 (d,e,f) inkubierter Träger der Peptidbibliothek. Die Anregungswellenlängen der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgte für bb17 mit 550 nm (Emission bei 605 nm) und für bb15 mit 470 nm (Emission bei 525 nm). (a1, d1) Beispiele für als stark wirkstoffaffine bewertete Träger wurden in Boxen abgebildet. (a2, d2) Zugehörige optische Durchlicht-Mikroskopiebilder der in a1 und d1 gezeigten Bereiche wurden dargestellt. (b1,e1) Kontrollexperimente des verwendeten Harzes (ChemMatrix® Harz) ohne immobilisierte Peptide zeigten keine Fluoreszenz und somit keine Bindung der potentiellen Wirkstoffe bb17 und bb15. (b2,e2) Zugehörige Durchlicht-Mikroskopiebilder der in b1 und e1 dargestellten Bereiche. (c1,f1,c2,f2) Auch bei der verwendeten Peptidbibliothek konnte keine Eigenfluoreszenz der immobilisierten Peptide detektiert werden (Fluoreszenz- und Durchlichtmodus).<sup>[153]</sup>



In beiden Screening-Verfahren wurden ca. 7000 inkubierte Bibliotheks-Partikel fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigten im Durchschnitt ca. 1% der Träger eine hohe Fluoreszenz-Intensität somit eine hohe Wirkstoffanreicherung. Je 30 positive Treffer wurden im bb17- und bb15-Screening isoliert und die zugehörigen Peptidsequenzen mittels MALDI-MS/MS identifiziert. Es ergaben sich 21 Peptidsequenzen mit hoher Anreicherung an bb17 (**Tab. 3**) und 26 Sequenzen, die gute Wechselwirkungen mit bb15 eingehen können sollten (**Tab. 4**).<sup>[153]</sup>

**Tab. 3.** MS/MS-Analyseergebnisse der Peptide der isolierten Bibliotheksträger mit hoher Anreicherung an bb17. Pos = Position innerhalb der Peptidsequenz.<sup>[153]</sup>

	NH <sub>2</sub> - Pos1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion Score	Konjugat Synthese
1	S	F	F	S	F	F	Q	65	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG
2	F	F	F	E	L	Q	L	64	-
3	L	K	F	F	S	E	G	48	-
4	G	G	L	Q	F	F	L	47	-
5	S	L	E	E	L	F	S	44	-
6	E	Q	F	F	F	F	F	44	-
7	G	S	G	F	F	K	Q	39	-
8	Q	Q	G	G	L	F	F	36	-
9	S	L	K	F	L	F	Q	36	-
10	L	F	F	G	L	F	S	35	-
11	L	F	F	Q	Q	G	L	33	-
12	F	F	Q	K	Q	Q	G	29	Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG
13	F	K	F	S	G	Q	F	24	-
14	S	G	E	E	E	F	F	24	-
15	L	L	Q	K	Q	F	F	21	-
16	S	K	L	E	E	E	F	19	-
17	Q	S	Q	F	L	L	K	16	-
18	S	Q	Q	Q	L	L	F	16	-
19	F	F	F	F	L	Q	Q	15	-
20	S	F	F	Q	Q	Q	E	13	-
21	L	F	Q	Q	S	L	F	10	-
22	S	F	F	E	F	F	Q	*	Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG

\*: Diese Sequenz wurde nicht im Screening gefunden, sondern repräsentiert den Trend der Gesamtheit der gefundenen Aminosäuren bezüglich ihrer Position im Peptid. Farbcode: Aromatisch/hydrophob: gelb; anionisch/polar: blau; kationisch/polar: rot; polar: grün.

**Tab. 4.** MS/MS-Analyseergebnisse der Peptidsequenzen der isolierten Bibliotheksträger mit hoher Anreicherung an bb15. Pos = Position innerhalb der Peptidsequenz.<sup>[153]</sup>

	NH <sub>2</sub> -Pos1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion Score	Konjugat Synthese
1	F	E	E	E	F	F	S	53	-
2	Q	Q	F	E	F	F	G	49	-
3	L	L	F	F	L	G	S	45	-
4	K	Q	F	L	Q	E	F	42	-
5	Q	F	F	G	S	F	Q	40	-
6	Q	Q	Q	F	F	E	E	39	-
7	K	Q	L	F	L	G	S	39	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG
8	Q	Q	F	L	L	Q	F	38	Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG
9	K	L	L	F	F	F	G	38	-
10	F	S	F	F	G	F	S	36	-
11	Q	Q	F	G	F	F	F	36	-
12	F	L	L	F	F	G	K	34	-
13	E	Q	S	F	F	Q	Q	34	-
14	E	S	F	L	F	L	L	34	-
15	E	L	F	F	Q	E	S	33	-
16	L	S	K	K	Q	L	L	32	-
17	F	Q	K	L	E	L	F	32	-
18	S	E	K	Q	S	F	F	31	-
19	L	S	Q	Q	Q	F	F	29	-
20	L	Q	K	F	F	F	G	27	-
21	E	E	F	G	Q	K	F	26	-
22	F	F	Q	Q	E	L	E	26	-
23	F	L	E	Q	K	E	F	25	-
24	F	L	L	F	Q	K	Q	25	-
25	F	L	F	L	E	Q	Q	23	-
26	F	L	S	L	L	L	F	21	-

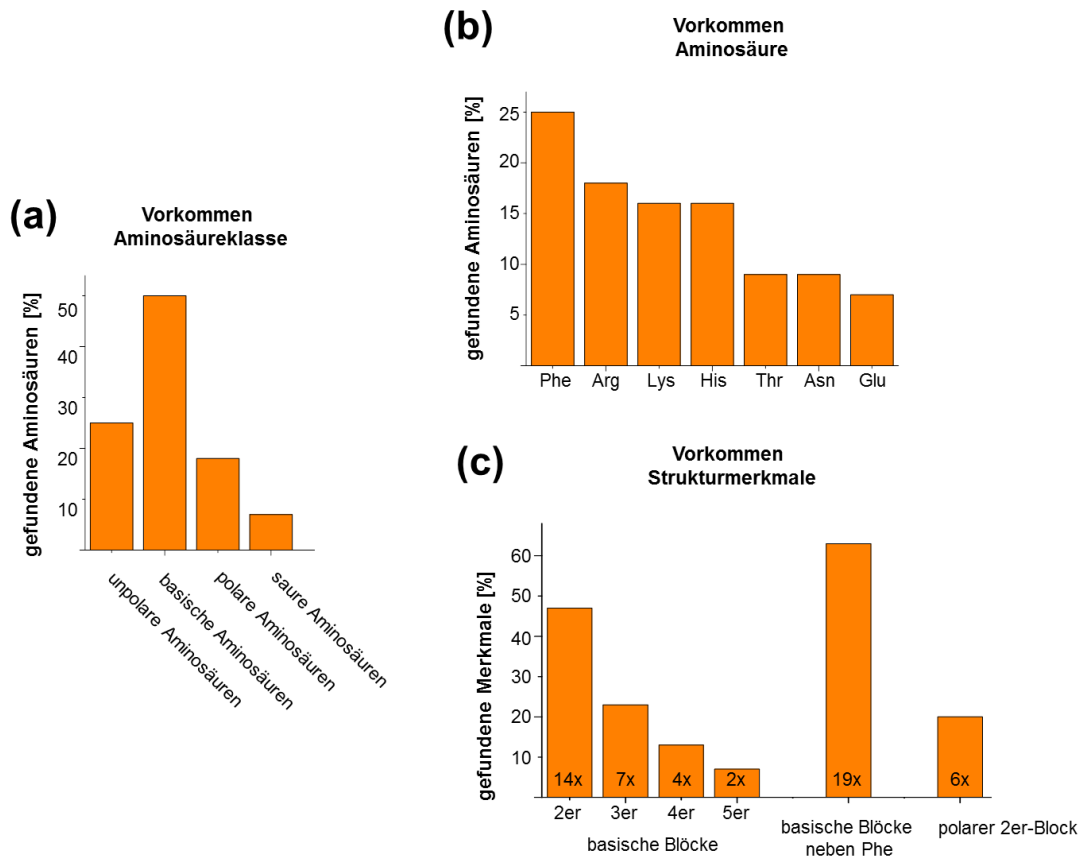
Farbcode: Aromatisch/hydrophob: gelb; anionisch/polar: blau; kationisch/polar: rot; polar: grün.

### 3.1.6. Synthese wirkstoffaffiner Peptid-Polymer-Konjugate

#### N-Phenylamin B4A1

Mithilfe des Screeningverfahrens konnten 30 Peptidsequenzen mit hoher B4A1-Kapazität identifiziert werden (**Tab. 1**). In Übereinstimmung mit der Struktur von B4A1, die vor allem durch die aromatischen Einheiten und zwei Carboxylgruppen charakterisiert ist, enthielten die ermittelten Sequenzen vorrangig Phe (25%) und die drei basischen Aminosäuren Arg, His und Lys (insgesamt 50%). Wie erwartet schienen sich hauptsächlich hydrophobe und ionische Wechselwirkungen zwischen Peptid und Wirkstoff auszubilden. Die polaren Aminosäuren Thr und Asn spielten mit insgesamt 18% eine eher untergeordnete Rolle, sodass sich Wasserstoffbrücken zwischen Thr oder Asn und der polaren Diamin-Pyrimidin-Kerneinheit von B4A1 wahrscheinlich nur vereinzelt ausbildeten. Auch Glu trat mit 7% nur statistisch auf, da B4A1 über keine basische funktionelle Gruppe verfügt, mit der Glu ionische Wechselwirkungen eingehen könnte. Strukturell auffällig war, dass die basischen

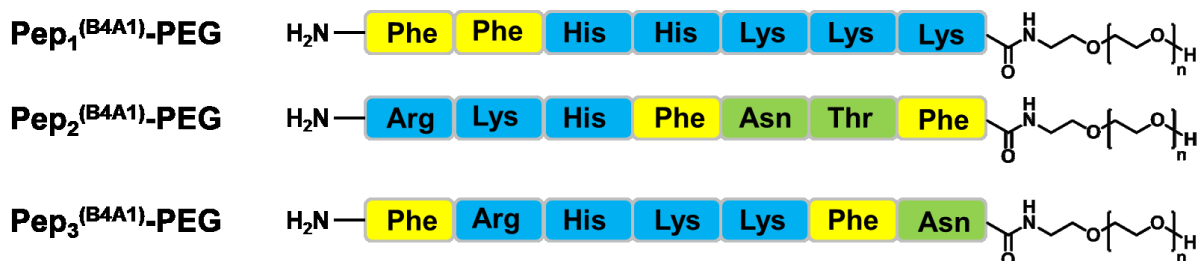
Einheiten in den Peptiden meist in Zweier- bis Fünferblöcken auftauchten. In 63% aller Peptidsequenzen traten diese Blöcke flankiert von einem Phe auf. Waren die polaren Aminosäuren Thr und Asn vorhanden, so traten auch diese oft in Zweier-Blöcken auf (**Abb. 21**).



**Abb. 21.** Darstellung der Vorkommen (a) der Aminosäureklassen, (b) der Aminosäuren und (c) der Strukturmerkmale, die sich in den Peptidsequenzen des B4A1-Screenings zeigten.

Um die Wirkstoffkapazität der identifizierten Peptidsequenzen in Solubilisierungs- und weiterführenden Biotests überprüfen zu können, wurden drei strukturell ähnliche Sequenzen des Screenings als Peptid-PEG-Konjugate ( $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{B4A1})}$ -PEG) synthetisiert (**Abb. 22**). Jede der drei zugehörigen Peptidsequenzen wurde vor allem durch das Auftreten eines zusammenhängenden kationischen Aminosäureblocks charakterisiert. Dieses Segment umfasste in  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG einen Fünferblock bestehend aus His und Lys, in  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG einen Dreierblock aus Arg, Lys und His und in  $\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$ -PEG einen Viererblock, ebenfalls bestehend aus allen drei basischen Aminosäuren Arg, Lys und His. Auffällig war auch das Auftreten von His an Peptidposition drei in allen ausgewählten Konjugaten, offenbar eine entscheidende Stelle für eine ionische Wechselwirkung zwischen Peptid und B4A1. Die kationischen Blöcke waren oft durch das aromatische Phe flankiert, das sich im Peptid meist an den beiden äußeren Peptidpositionen und nur bei  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG in der zentralen Position vier befand.  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG wies zudem eine Phe-Phe-Dyade auf, während in  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG und  $\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$ -PEG nur einzelne Phe auftraten. Weiterhin wies  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG keine polare

Aminosäure auf,  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG beinhaltete jedoch einen polaren Asn-Thr-Abstandshalter im aromatischen Block und  $\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$ -PEG ein terminales Asn. Die Peptid-PEG-Konjugate mit PEG-Blöcken von  $M_n = 3.2 \text{ kDa}$  wurden nach einer inversen Konjugationsstrategie der Festphasen-Peptidsynthese hergestellt.<sup>[158]</sup> Alle chemischen Strukturen der Konjugate wurden nach deren Abspaltung vom Trägerharz mittels Massenspektrometrie,  $^1\text{H-NMR}$ - und IR-Spektroskopie überprüft.<sup>[8b, 8c]</sup>



**Abb. 22.** Strukturen der Peptid-PEG-Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{B4A1})}$ -PEG. Die Konjugate sollten als Formulierungsadditive für den potentiellen Wirkstoff B4A1 eingesetzt werden, um eine höhere Bioverfügbarkeit der schlecht löslichen Substanz in wässriger Umgebung zu ermöglichen.<sup>[8b, 8c]</sup>

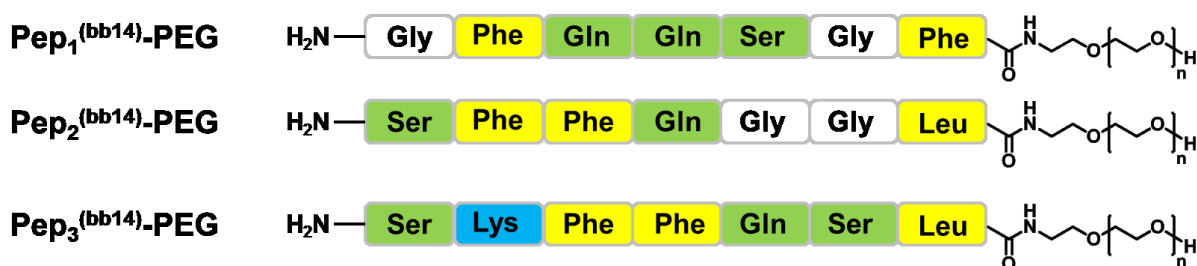
### Rhodanin bb14

Um das Konzept der spezifischen Wirkstoffsolubilisierung durch Peptid-Polymer-Konjugate zu bestätigen, wurde die Substanzklasse der Rhodanine ebenfalls mit der Raman-mikroskopischen Screeningmethode untersucht. Da das Rhodaningrundgerüst strukturell stark vom *N*-Phenylamin B4A1 abweicht, sollten sich deutliche Unterschiede in den wirkstoffaffinen Peptidsequenzen wiederfinden. Die Identifikation von 22 Peptidsequenzen mit hoher Anreicherung an bb14 (**Tab. 2**) zeigte, dass bei der Bindung von bb14 vor allem hydrophobe (26% Phe und Leu) und polare Wechselwirkungen (47% Gln und Ser) von Bedeutung waren. Hierfür boten die strukturellen Elemente von bb14 die passenden Gegenstücke: Die aromatischen Indol-, Furanyl- und Benzyl-Einheiten eigneten sich offenbar für  $\pi\pi$ -stacking und hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe, die polaren Rhodanin- und Amin-Einheiten, sowie der phenylische Chlorsubstituent für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Gln und Ser (**Abb. 26b**).

Die polaren Aminosäuren traten häufig in Zweier- bis Viererblöcken in den identifizierten Sequenzen auf. Weniger häufig konnten Glu und der Abstandshalter Gly mit 14% und 12% gefunden werden. Da Gly keine funktionellen Seitengruppen aufweist, lag dessen Funktion wahrscheinlich eher darin, dem Peptid eine höhere Flexibilität zu ermöglichen, sodass eine bessere Anordnung des Peptids um den Wirkstoff bb14 erfolgen konnte. Das nur geringe Vorkommen von Leu (10%) im Vergleich zu Phe (16%) zeigte, dass die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Peptid und Wirkstoff offenbar vorrangig aromatischer Natur waren. Vor allem im Vergleich mit bb17 und bb15 (**vgl. Kapitel 3.1.6., Abb. 26c,d**), deren wirkstoffaffine Peptidsequenzen deutlich mehr Phe und Leu aufwiesen, wäre es möglich, dass die furanylangrenzende Aryleinheit von bb14 durch den Chlorsubstituent deutlich elektronenärmer ist als die Aryleinheiten von bb17 und bb15, da insgesamt viel weniger hydrophobe als polare Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen eingegangen wurden. Lys hatte mit nur 1% Anteil an allen im Screening gefundenen Aminosäuren offensichtlich keinen

Einfluss auf die Wirkstoffbindung. Die Aminosäureverteilung der identifizierten Peptide unterschied sich auch deutlich von der für das *N*-Phenylamin B4A1 aufgefundenen. Während Sequenzen mit hoher Anreicherung an bb14 vorrangig polare Aminosäuren und etwas weniger häufig hydrophobe Aminosäuren beinhalteten, schienen für die B4A1-Bindung vor allem hydrophobe und basische Aminosäuren eine Rolle zu spielen. Dies erscheint in Anbetracht der Funktionalitäten der Wirkstoffe sinnvoll.

Von den identifizierten Peptidsequenzen der MALDI-MS/MS-Analyse für bb14 wurden die drei vielversprechendsten als zugehörige Peptid-PEG-Konjugate (Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG) synthetisiert (vgl. **Exp. Teil**) (**Abb. 23**). Da der Struktur von bb14 entsprechend hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wirkstoff und Peptid am wahrscheinlichsten zu einer effektiven Bindung führten, wurden Sequenzen mit hohem Anteil an Phe, Leu, Gln und Ser ausgewählt, um diese Wechselwirkungen zu begünstigen. Ihre strukturelle Ähnlichkeit spiegelte sich in der Aminosäureverteilung wieder. Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG enthielten je zwei Phe und zwei bis drei polare Aminosäuren. Auf Peptidposition sieben befand sich in allen Fällen eine hydrophobe Aminosäure Phe oder Leu und auf Position zwei und drei kam es zu einer Anhäufung von Phe. Das Segment Phe-Phe-Gln fand sich sowohl in Pep<sub>2</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG als auch in Pep<sub>3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG wieder und könnte für die Wirkstoffbindung von Bedeutung sein. Unterschiedlich war das Vorkommen des Abstandshalters Gly. Während sich in Pep<sub>3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG kein Gly befand, traten in Pep<sub>1</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG je zwei Gly auf. Zudem fiel das blockartige Auftreten der polaren Aminosäuren Ser und Gln in Pep<sub>1</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG und Pep<sub>3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG im Gegensatz zur separierten Verteilung in Pep<sub>2</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG auf.<sup>[8b, 8c]</sup>



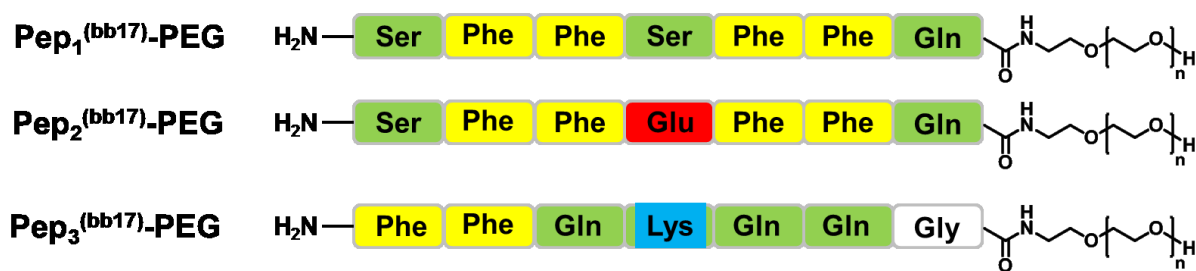
**Abb. 23.** Synthetisierte Peptid-PEG-Konjugate Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG. Die Peptidsequenzen der Konjugate wurden im Screening des potentiellen Wirkstoffs bb14 identifiziert und sollten eine hohe Affinität zum Wirkstoff aufweisen.<sup>[8b, 8c]</sup>

#### Rhodanin bb17

Von nur geringfügigem strukturellen Unterschied zum Rhodanin bb14 war der potentielle Wirkstoff bb17. Daher war von großem Interesse, ob auch zwischen diesen beiden ähnlichen Stoffen generelle Unterschiede in den maßgeschneiderten Peptidsequenzen aufzufinden waren. Das Fluoreszenz-Mikroskopie-basierte Screening ergab 21 Peptidsequenzen mit potentiell hoher Kapazität zum Wirkstoff bb17 (**Tab. 3**). Insgesamt wurden dabei hauptsächlich die hydrophoben Aminosäuren Phe (33%) und Leu (16%) gefunden. Offensichtlich wies die Biaryleinheit von bb17 eine höhere Aromatizität als die Benzyleinheit von bb14 auf, sodass es vermehrt zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen und  $\pi\pi$ -stacking kommen konnte (**Abb. 26c**). Der Anteil an Phe deckte sich mit den Ergebnissen

Polare Wechselwirkungen zwischen bb17 und den Aminosäuren Gln und Ser (29%) traten dem Anschein nach recht häufig auf und bildeten sich vermutlich zwischen den polaren Rhodanin- und Amin-Einheiten von bb17 und Gln, bzw. Ser aus. Ionische Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Glu (8%) und Lys (5%), ebenso wie mit dem Abstandshalter Gly (8%) schienen eher vereinzelt aufzutreten. Die Positionierung der Aminosäuren in den Peptidsequenzen zeigte, dass eine blockartige Anordnung der hydrophoben Aminosäuren Phe und Leu für eine hohe Anreicherung an bb17 von Vorteil war. Meist wurden diese Blöcke von den polaren Aminosäuren Ser und Gln flankiert. Das Segment Phe-Phe-Ser bzw. Phe-Phe-Gln trat sieben Mal in den identifizierten Sequenzen auf und könnte für die Bindung des Wirkstoffs oder die Präsentation der Phe-Phe-Dyade von Bedeutung sein. Die Aminosäure Glu war verstärkt auf der zentralen Position vier im Peptid zu finden.

Eine mit Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG eng verwandte Sequenz Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG wurde ebenfalls als Peptid-PEG-Konjugat synthetisiert. Die Sequenz stellte die Trends der gefundenen Positionen der verschiedenen Aminosäuren dar und unterschied sich von Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup> nur in der zentralen Position vier, an der Ser durch Glu ersetzt wurde. Da das Screening Glu viermal an der Position vier gezeigt hatte, sollte der Effekt eines Glu an zentraler Stelle einen direkten Einfluss auf die Wirkstoffbindung haben.<sup>[153]</sup>



50

Rhodanin bb15

Von allen vier untersuchten potentiellen Wirkstoffen sind sich bb17 und bb15 strukturell am ähnlichsten. Die aktiven Substanzen unterscheiden sich lediglich in der an das Furan angrenzenden Biaryleinheit – eine Phenyl-Pyrrol-Einheit im Fall von bb17 und eine Biphenyleinheit im potentiellen Wirkstoff bb15. Im folgenden Screening zur Auffindung von Peptidsequenzen mit hoher bb15-Kapazität sollten sich trotz dieser nur geringfügigen strukturellen Abweichungen im Vergleich zu bb17 allgemeine Unterschiede in den Peptidsequenzen finden lassen. Mittels MALDI-MS/MS konnten 26 Peptidsequenzen mit potentiell hoher bb15-Affinität identifiziert werden (**Tab. 4**). Wie beim Screening von bb17 war der Anteil an den Aminosäuren Phe (32%), Gln (19%) und Leu (18%) am höchsten (**Abb. 26d**). Wahrscheinlich bildeten sich  $\pi\pi$ - und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Phe oder Leu und bb15 aus. Zwischen Gln und bb15 könnten vorrangig polare Wechselwirkungen auftreten. Während das Verhältnis zwischen Phe, Gln und Leu bei den Screeningverfahren von bb17 und bb15 nahezu identisch war, fand sich im Screening von bb15 verglichen mit dem von bb17 deutlich mehr Glu (11%) als Ser (8%) wieder. Die Aminosäuren Lys und Gly spielten mit 7% und 6% erneut keine bedeutende Rolle. Hydrophobe Aminosäuren traten hier besonders oft in Zweier- bis Fünferblöcken und in den zentralen Positionen im Peptid auf.

Von den 26 bb15-affinen Peptidsequenzen (**Tab. 4**) wurden für anschließende Löslichkeitsexperimente und darauf folgende Biotests zwei der Sequenzen als Peptid-PEG-Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG synthetisiert (**vgl. Exp. Teil**) (**Abb. 25**). Mit den zentralen hydrophoben Blöcken Leu-Phe-Leu bzw. Phe-Leu-Leu repräsentieren sie die eher amphiphilen Eigenschaften des potentiellen Wirkstoffs. Auch zwei oder drei polare Aminosäuren waren in jeder Sequenz enthalten, die die hydrophoben Blöcke flankierten.  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG verfügt zudem über die basische Aminosäure Lys und den Abstandshalter Gly.<sup>[153]</sup>

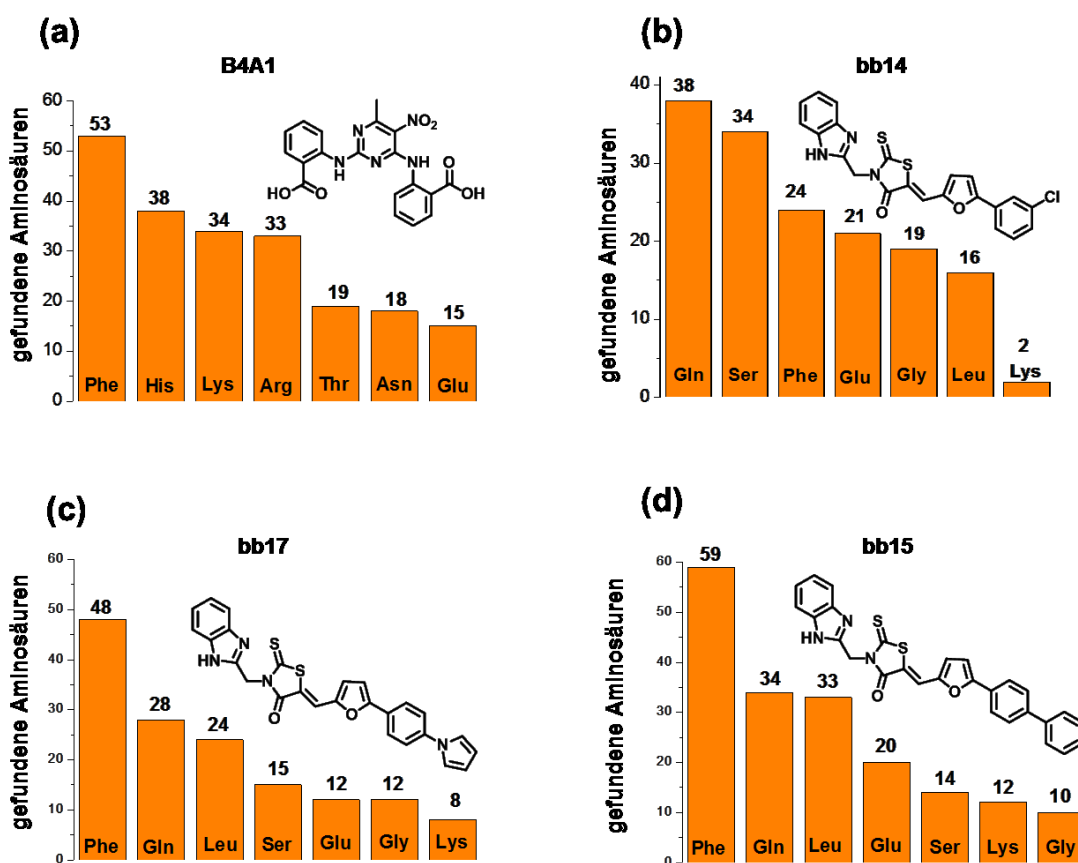


**Abb. 25.** Peptid-PEG-Konjugate  $\text{Pep}_{1,2}^{(\text{bb15})}$ -PEG zur Solubilisierung des potentiellen Wirkstoffs bb15. Durch Bindung von bb15 in einem wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplex soll die Bioverfügbarkeit der schwer löslichen Substanz in wässriger Umgebung verbessert werden.<sup>[153]</sup>

Damit konnte die etablierte, auf Fluoreszenz-Mikroskopie-basierte Screeningmethode zur Identifizierung von Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffkapazität am Beispiel von bb17 und bb15 bestätigt werden.<sup>[13a]</sup> Vor allem aber war die Erweiterung der Prozedur auf Raman-aktive Wirkstoffe möglich. Am Beispiel des *N*-Phenylamins B4A1 und des Rhodanins bb14 konnten in einer automatisierten Messmethode eine Auswahl an Peptidsequenzen identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit gute Bindungen zu den aktiven Substanzen ausbildeten.



Im Folgenden wurden die Verteilungen der in den Screeningprozeduren gefundenen Aminosäuren mit den zugehörigen Strukturen der potentiellen Wirkstoffe B4A1, bb14, bb17 und bb15 in einer Übersicht dargestellt. Jedes Screening zeigte für den Wirkstoff verschiedene und spezifische Wechselwirkungen auf, die zwischen Peptid und Wirkstoff eingegangen werden könnten (**Abb. 26**). Das B4A1-Screening brachte vorwiegend Peptidsequenzen mit aromatischen und basischen Aminosäuren hervor. Diese könnten die Gegenstücke für die Ausbildungen von  $\pi\pi$ - und ionischen Wechselwirkungen mit den aromatischen Einheiten und Carboxylgruppen des Wirkstoffs darstellen. Die Screeningprozeduren der Rhodanine bb14, bb17 und bb15 brachten überwiegend hydrophobe und polare Aminosäuren hervor, was in Anbetracht der Wirkstoffstrukturen sinnvoll erscheint. Mit den aromatischen Einheiten der Wirkstoffe könnten hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden und die polaren Teile der Moleküle könnten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren dienen. Interessanterweise kam es für die strukturell sehr ähnlichen Rhodanin-Wirkstoffe zu unterschiedlichen Ergebnissen der Aminosäureverteilungen. So unterschieden sich die Verhältnisse hydrophober zu polaren Aminosäuren von Wirkstoff zu Wirkstoff deutlich. Auch die Häufigkeiten innerhalb dieser Untergruppen variierten je nach Rhodanin. Die Spezifität des Ansatzes der maßgeschneiderten Wirkstoffsolubilisierung konnte hiermit bestätigt werden.



**Abb. 26.** Statistische Verteilung der in den Screenings von (a) B4A1, (b) bb14, (c) bb17 und (d) bb15 gefundenen Aminosäuren der identifizierten Peptidsequenzen mit den zugehörigen Strukturen der potentiellen Wirkstoffe.<sup>[8b, 8c, 153]</sup>



## 3.2. Charakterisierung der Wirkstoff-Solubilisator-Systeme

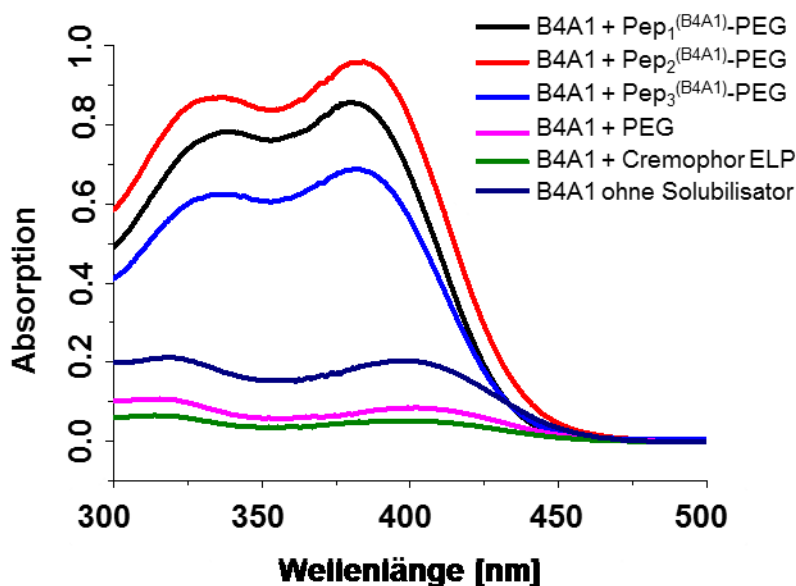
Für jeden der vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkstoffe wurden in Screeningprozeduren potentiell wirkstoffaffine Peptidsequenzen identifiziert (**vgl. Kapitel 3.1.1.-3.1.5.**). Pro Wirkstoff wurden zwei oder drei Peptid-PEG-Konjugate auf Grundlage der erhaltenen Sequenzen synthetisiert (**vgl. Kapitel 3.1.6.**). Im Folgenden sollten die Konjugate die potentiellen, schlecht wasserlöslichen Wirkstoffe über die Seitenfunktionalitäten der Peptide binden und lösliche Wirkstoff-Konjugat-Komplexe ausbilden. Diese Systeme sollten bezüglich ihrer Wirkstoffkapazität und kolloidalen Größen untersucht werden. Exemplarisch am Beispiel von B4A1 sollten zudem Spezifitätsnachweise der Wirkstoffbindung und Auswirkungen der PEG-Längen im Konjugat studiert werden.

### 3.2.1. *N*-Phenylamin B4A1

#### Solubilisierung von B4A1 durch Peptid-PEG-Konjugate

Ein geeigneter und effizienter Solubilisator sollte den unlöslichen Wirkstoff in einer möglichst leicht zu realisierenden Methodik binden. Zudem sollte vorzugsweise wenig Solubilisatormaterial für eine effektive Löslichkeitsvermittlung eingesetzt werden. Auf diese Weise können Kosten gespart und Wechselwirkungen des Solubilisators mit Komponenten von Folgeanwendungen minimiert werden.

Im Rahmen einer forcierten Beladungsprozedur wurde der potentielle Wirkstoff B4A1 mit den gut wasserlöslichen Konjugaten Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG versetzt.<sup>[13a]</sup> Dafür wurde das jeweilige Konjugat in Wasser gelöst (2.44 mM), zum Wirkstoff in DMSO (2.44 mM) gegeben und die Mischung gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mit Wasser versetzt und nicht gelöster Wirkstoff abzentrifugiert. Ausführliche Untersuchungen des Überstands der Lösung wurden anschließend durchgeführt. Die Ermittlung der maximalen Beladungskapazitäten der Konjugate in der wässrigen Lösung erfolgte durch UV/Vis-Spektroskopie bei 384 nm. Als Referenzexperimente dienten die Formulierungsadditive PEG und Cremophor ELP, ein in klinischen Studien genutzter, unspezifisch bindender Solubilisator.<sup>[107]</sup> Auch die Löslichkeit von B4A1 in Wasser ohne Zusatz eines Solubilisators wurde vergleichend herangezogen (**Abb. 27**).<sup>[8b, 8c, 13a]</sup>



**Abb. 27.** UV/Vis-Absorptionsspektren der Komplexsysteme B4A1/Peptid-PEG. Die Darstellung zeigt die maximalen Wirkstoffkapazitäten der Konjugate bei einer festen Konjugatkonzentration. Kontrollexperimente mit PEG, Cremophor ELP oder in reinem Wasser ohne Konjugatzusatz verdeutlichen die geringe Wasserlöslichkeit von B4A1. (Bedingungen: [Konjugat; PEG; Cremophor ELP] = 2.44 mM, Raumtemperatur, pH = 7, Verdünnung 1:50).<sup>[8b, 8c]</sup>

In Abhängigkeit von der Peptidsequenz konnten für die drei Peptid-PEG-Konjugate unterschiedliche Beladungskapazitäten ermittelt werden. So zeigten Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG mit den Peptidsequenzen FFHHKKK (Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>) und RKHFNTF (Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>) die höchsten Beladungswerte mit molaren Verhältnissen von 0.83 und 0.91 (B4A1/Konjugat). Pep<sub>3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG mit der Sequenz FRHKKFN hingegen erreichte lediglich ein molares Verhältnis von 0.53 (B4A1/Konjugat).

Die blockartige Anhäufung aromatischer und kationischer Aminosäuren in der Peptidsequenz könnte dementsprechend höhere Beladungskapazitäten begünstigen. Desweiteren schienen polare, flexible Abstandshalter wie Asn und Thr zwischen den beiden Phe wie bei Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG ebenfalls vorteilhaft zu sein. Auf diese Weise konnte durch die Solubilisierung von B4A1 durch Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG ein beinahe stöchiometrisches molares Wirkstoff:Solubilisator-Verhältnis ( $1:1.1 \pm 0.1$ ) realisiert werden – eine Erhöhung der Konzentration von B4A1 in wässriger Lösung um das 20-fache verglichen mit der Löslichkeit des Wirkstoffs in Wasser ohne Zusatz eines Löslichkeitsvermittlers. Mit molaren Wirkstoff:Solubilisator-Verhältnissen von  $1:1.2 \pm 0.1$  für Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und  $1:1.9 \pm 0.1$  für Pep<sub>3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG konnten ebenfalls sehr gute Solubilisierungskapazitäten erhalten werden. Besonders hervorzuheben ist zudem, dass die ermittelten Kapazitäten der neu entwickelten Peptid-PEG-Konjugate die Kapazität der Referenz Cremophor ELP um das fünf- bis siebenfache übertrafen. Dieser Löslichkeitsvermittler, bereits in klinischem Einsatz, erreichte lediglich ein molares Verhältnis von 1:7.4 (B4A1/Cremophor ELP). Ohne Zusatz eines Formulierungsadditivs oder durch Solubilisierung mit PEG war der Wirkstoff B4A1 sehr schlecht wasserlöslich (**Abb. 27**).

Auch die Werte der Gewichtsprozent (Gew.-%) der Wirkstoffmoleküle in den Komplexen pro Gewichtseinheit der Konjugate zeugten von großer Effizienz der Solubilisatoren. So ergaben sich 8.1 Gew.-% an B4A1 im Komplex B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, 8.9 Gew.-% an B4A1 im Komplex B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und 5.1 Gew.-% an B4A1 im Komplex B4A1/Pep<sub>3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG. Damit befinden sich die B4A1-Formulierungsadditiv-Systeme bereits im Bereich der allgemein anerkannten Gew.-%-Verhältnisse von Wirkstoffformulierungen. Angemessene Werte liegen hierbei für die meisten hydrophoben Wirkstoffe zwischen 5% und 25%.<sup>[159]</sup> Insgesamt werden möglichst hohe Wirkstoffbeladungen für die Entwicklung von Formulierungsadditiven angestrebt, da auf diese Weise die Mengen des Transportsystems in der therapeutischen Anwendung gering gehalten werden können.<sup>[160]</sup> Die Effektivität der Löslichkeitsvermittler Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG konnte somit erfolgreich bewiesen werden.<sup>[8b, 8c]</sup>

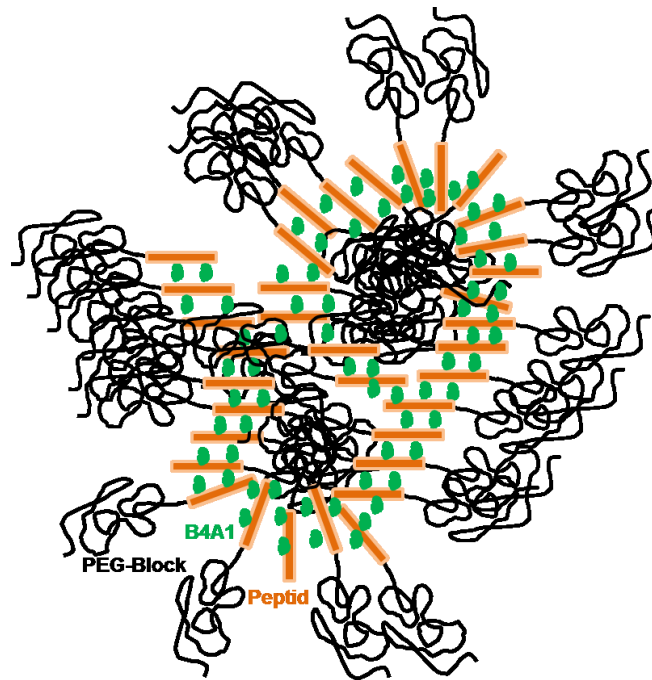
#### Ermittlung der hydrodynamischen Radien der B4A1-Komplexe

Zur Charakterisierung der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe war nicht nur die Untersuchung der Löslichkeitsvermittlung durch Peptid-PEG-Konjugate von Nutzen, sondern auch die Analyse der kolloidalen Größe der Komplexe. Vor allem in biomedizinischen Anwendung der zielgerichteten Anreicherung und Freisetzung von Wirkstoffen (engl.: Drug targeting) spielt die Größe der Wirkstoff-Solubilisator-Systeme eine entscheidende Rolle. Gemeinsam mit der Anzahl der Bindungsstellen eines Wirkstoffs an einem Targetmolekül und der Affinität des Trägermoleküls zum Wirkstoff ergibt sich mit der Größe der Komplexsysteme die Effizienz eines Wirkstoffs in Anwendungen.<sup>[161]</sup>

Zur Bestimmung der Größe der wirkstoffbeladenen Komplexe wurden DLS-Analysen durchgeführt. Für das System B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG wurde ein hydrodynamischer Radius ( $R_h$ ) von 105 nm, für B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG ein  $R_h$  = 175 nm und für B4A1/Pep<sub>3</sub>(B4A1)-PEG ein  $R_h$  = 110 nm ermittelt. Vor der Wirkstoffbeladung konnten keine  $R_h$  für die Konjugate bestimmt werden, sodass die Formulierungsadditive offenbar molekular gelöst vorlagen. Dementsprechend erfolgte bei der Versetzung von B4A1 mit den Konjugaten offensichtlich eine wirkstoffinduzierte Aggregation. Dies erscheint sinnvoll, da die Wirkstoffe und Peptide aufgrund ihrer chemischen Strukturen an verschiedenen Positionen Wechselwirkungen eingehen können. Die auftretende Aggregation könnte auch für die spätere Verwendung der Komplexe in einem Biosystem von Vorteil sein, da die molare Masse des Wirkstoffs stark erhöht wird. Dadurch könnte es zu einem geringeren Abbau des Wirkstoffs durch die Nieren und damit zu einer höheren Wirkstoffkonzentration am Zielort der Anwendung kommen.<sup>[144]</sup>

Eine mögliche Struktur der B4A1-Konjugat-Komplexe wurde in **Abb. 28** dargestellt. Da sowohl der Wirkstoff als auch die Peptide hydrophile Eigenschaften aufweisen und weniger stark vom Lösungsmittel Wasser abgestoßen werden als stark hydrophobe Substanzen wäre es denkbar, dass die PEG-Moleküle nicht zwangsweise nach außen ragen müssten, sondern sich auch im Inneren des Komplexes verknäulen könnten. Die vom Wasser gequollenen PEG-Moleküle würden dann im Inneren der Systeme sehr viel Platz einnehmen, sodass sich die recht großen  $R_h$  der B4A1-Systeme erklären ließen. Wie die Simulation der B4A1-Komplexe zeigte, waren diese von sehr dynamischer Struktur, was mit dieser Art von Modell ebenfalls veranschaulicht werden könnte. Da die Positionen von Wirkstoff und Konjugaten in

solch einer Art von Komplex leicht wechseln könnten, bestünde eine hohe Wahrscheinlichkeit der Wirkstoffbindung.<sup>[162]</sup>



**Abb. 28.** Mögliches Modell der B4A1-Konjugat-Komplexe. Aufgrund der höheren Hydrophilie des Wirkstoffs (Darstellung in grün) und der Peptidsequenzen (Darstellung in orange) ist eine offenere und dynamischere Anordnung der Konjugate im Komplex wahrscheinlich, in der die Positionen der PEG-Blöcke (Darstellung in schwarz) nicht eindeutig vorgegeben sind.

Das Referenzsystem des herkömmlich unspezifisch bindenden Löslichkeitsvermittlers Cremophor ELP zeigte bei der Beladung mit B4A1 keine wirkstoffinduzierte Aggregation auf. Vor und nach der Beladung mit B4A1 in Wasser wiesen die Cremophor-Aggregate einen  $R_h = 12-13$  nm auf.<sup>[8b, 8c]</sup> Möglicherweise können die Cremophor-Aggregate nur eine bestimmte Anzahl an B4A1-Molekülen aufnehmen, da sich bereits vor der Wirkstoffbeladung relativ stabile Aggregate ausbilden, die nur eine begrenzte Menge an Bindungsstellen für unpolare Wechselwirkungen im Inneren der Aggregate anbieten. Sind alle möglichen Bindungsstellen besetzt, wäre es möglich, dass keine weiteren B4A1-Moleküle aufgenommen werden können, da wahrscheinlich die Cremophor-Cremophor-Wechselwirkungen in den Aggregaten stärker sind, als es mögliche multivalente Cremophor-B4A1-Wechselwirkungen wären. Dadurch könnte die Struktur der kleinen Cremophor-Aggregate aufrecht erhalten bleiben und nicht durch den Einfluss der B4A1-Moleküle aufgebrochen werden.

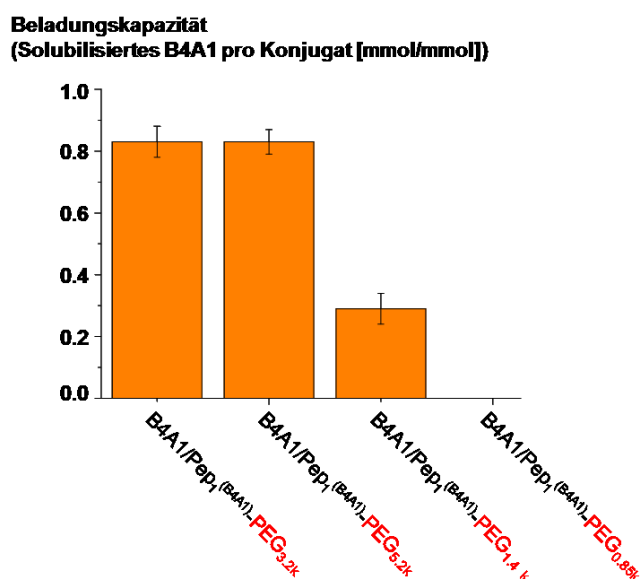
#### Variation des PEG-Blocks

Mit  $R_h$  von 105-175 nm für alle B4A1-Komplexe konnte nachgewiesen werden, dass durch die Wirkstoffbeladung der Konjugate eine induzierte Aggregation zu den komplexen Systemen auftrat (vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 2). Daraus ergab sich die Fragestellung,

inwiefern die Größe des PEG-Blocks Einfluss auf die Aggregatsgröße hat und welche PEG-Länge für die Solubilisierung notwendig ist. Die Stabilität der Kolloide und die Wasserlöslichkeit der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe wurden vor allem durch die PEG-Einheit der Konjugate kontrolliert. Zudem schirmten diese den Wirkstoff gegen das umgebende Lösungsmittel Wasser ab, wodurch wahrscheinlich auch eine bessere Stabilität des Wirkstoffs erreicht wurde.

Exemplarisch für das herkömmlich in der Arbeit verwendete System  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG, das einen PEG-Block der Größe 3.2 kDa aufweist, wurden die Konjugatäquivalente  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub>,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> und  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>0.85k</sub> mit entsprechenden PEG-Blöcken von 5.2 kDa, 1.4 kDa und 0.85 kDa nach der inversen Konjugationsstrategie synthetisiert (vgl. Exp. Teil). Die Beladung der Konjugate erfolgte nach der für  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> beschriebenen forcierten Beladungsmethode (vgl. Exp. Teil).<sup>[162]</sup>

Die Konjugate mit unterschiedlich großen PEG-Blöcken zeigten deutliche Unterschiede in der Wirkstoffkapazität. Während  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub> mit dem größten PEG-Block von 5.2 kDa B4A1 mit einem molaren Verhältnis von 1:1.2 (B4A1/Konjugat) ebenso effektiv wie das herkömmliche Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> solubilisieren konnte, konnte mit dem Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> lediglich ein molares Verhältnis von 1:3.4 (B4A1/Konjugat) erreicht werden (Abb. 29). Da das Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>0.85k</sub> B4A1 nicht solubilisieren konnte, war offensichtlich eine kritische Mindestlänge des PEG-Blocks für die effektive Wirkstoffsolubilisierung und Gewährleistung der kolloidalen Stabilität des Komplexes erforderlich. Dies schien ab einer PEG-Größe von 1.4 kDa möglich zu sein.

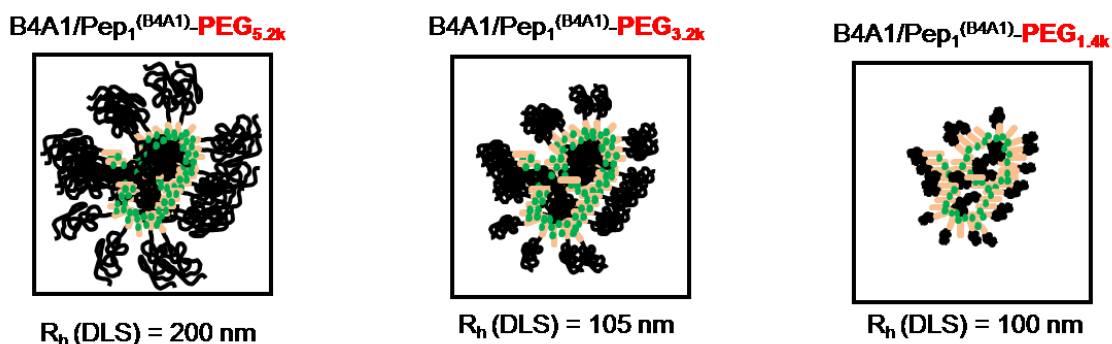


**Abb. 29.** Übersicht der Solubilisierung von B4A1 durch die Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub>,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> und  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>0.85k</sub> verglichen mit dem hauptsächlich in der Arbeit verwendeten Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub>. (Bedingungen: [Konjugate] = 2.44 mM, Raumtemperatur, pH = 7).<sup>[162]</sup>

Die molaren Wirkstoff:Solubilisator-Verhältnisse von  $1:1.2 \pm 0.1$  für B4A1/ $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub> und B4A1/ $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> zeigten ein nahezu äquimolares Verhältnis im B4A1-Konjugat-

Komplex. In Bezug auf die Materialkosten war jedoch ein PEG-Block von 3.2 kDa dem von 5.2 kDa vorzuziehen, da für diesen 40% weniger Konjugatmaterial anfiel und eine bessere renale Ultrafiltration zum Abbau des Konjugats zu erwarten wäre.<sup>[162]</sup> Auch bei ähnlichen Wirkstoff-Konjugat-Systemen für den Wirkstoff *m*-THPC zeigte sich diese Verhältnismäßigkeit, weshalb anzunehmen ist, dass das Peptidsegment bei Konjugaten ausschlaggebend für die Wirkstoffkapazität ist.<sup>[146, 162]</sup>

Die Untersuchung der Komplexe mittels DLS zeigte interessante Ergebnisse bezüglich der weiteren Anwendung der Systeme in Biotests, da sich die Größe der Komplexe z. B. auf die Zellpermeabilität auswirken könnte. Die  $R_h$  der B4A1-Konjugat-Komplexe nahmen dabei mit zunehmender Größe des PEG-Blocks zu, mit einem  $R_h = 100$  nm für B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4kDa</sub>,  $R_h = 105$  nm für B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und  $R_h = 200$  nm für B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>. Für B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>0.85</sub> konnte kein  $R_h$  bestimmt werden, da keine Solubilisierung von B4A1 durch dieses Konjugat möglich war (**Abb. 30**). Vor der Wirkstoffbeladung lagen alle Konjugate molekular gelöst vor. Der gegenteilige Trend – ein abnehmender  $R_h$  mit zunehmender PEG-Größe – war bei der kürzlich berichteten Solubilisierung des Wirkstoffs *m*-THPC durch maßgeschneiderte Peptid-PEG-Konjugate zu beobachten.<sup>[13a, 146]</sup> Dies entspricht der gängigen Aggregationstheorie der amphiphilen Block-Copolymere.<sup>[146]</sup> Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen und Eigenschaften der Wirkstoffe B4A1 und *m*-THPC lässt sich dieser Gegensatz erklären. Das stark hydrophobe *m*-THPC wurde durch ein ebenfalls stark hydrophobes Peptid mit der Bindungsdomäne FFLFF im maßgeschneiderten Konjugat gebunden. Dabei bildeten sich physikalisch vernetzte Aggregate aus, deren Inneres aufgrund starker Segregation nur wenig aufquellen konnte.<sup>[13a, 146]</sup> B4A1 und die Peptidsequenz FFHHKKK mit hoher B4A1-Kapazität hingegen wiesen eine höhere Polarität als das *m*-THPC-Äquivalent auf. Dementsprechend sollte das Innere des B4A1-Konjugat-Komplexes besser solvatisiert und aufgequollen vorliegen und der Komplex als Ganzes dynamischer sein (**vgl. Abb. 28**). Da die PEG-Blöcke möglicherweise nicht zwangsläufig außen, sondern auch im Innern des Aggregats auftreten könnten, würden die sterisch anspruchsvollen PEG-Blöcke erst recht eine Vergrößerung des  $R_h$  bewirken, da die großen Knäule zum Teil auch im Inneren des Komplexes untergebracht werden müssten (**Abb. 30**).



**Abb. 30.** Darstellung möglicher Modelle der B4A1-Konjugat-Komplexe Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> mit unterschiedlich großen PEG-Blöcken. Möglicherweise waren durch die höhere Hydrophilie des Wirkstoffs und der Peptidsequenzen die Positionen der Wirkstoff- (Darstellung in grün), Peptid- (Darstellung in orange) und PEG-Moleküle (Darstellung in schwarz) nicht starr wie in einer klassischen Mizelle vorgegeben. Mit der Zunahme der PEG-Länge stieg auch der  $R_h$  der komplexen Systeme, evtl. da die PEG-Knäule auch im Inneren des Komplexes untergebracht werden könnten.

Im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen wären kompaktere Wirkstoff-Konjugat-Komplexe von Vorteil. Generell könnten Partikel mit einem größeren  $R_h$  als 100 nm von den Phagozyten des Zellsystems entfernt werden, sodass sich verkürzte Zirkulationszeiten der Substanzen im Blut ergeben. Die besten Verteilungen im Zielgewebe, Penetration in kleine Gewebekapillaren und Blutzirkulationszeiten ergaben sich für Partikel mit einem  $R_h$  von 5-50 nm.<sup>[4]</sup> Dementsprechend wäre eine Reduzierung der Aggregatgrößen von  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub>,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> und  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> mit  $R_h = 100\text{-}200$  nm erstrebenswert.

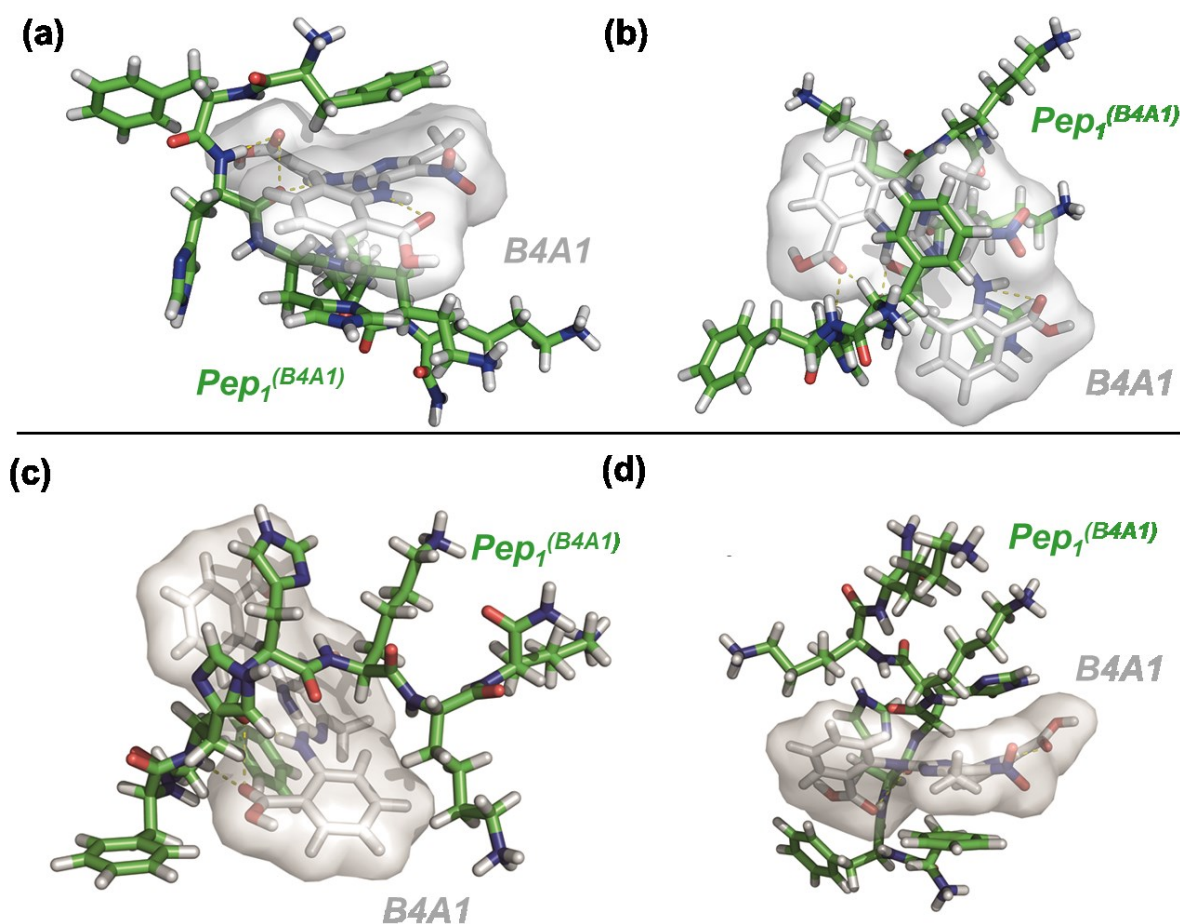
Insgesamt zeigten die Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub> und  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> mit den längsten PEG-Blöcken die besten Solubilisierungseigenschaften. Nahezu äquimolare Wirkstoff:Transporter-Verhältnisse konnten mit diesen Systemen erzielt werden. Offenbar war eine kritische Mindestlänge des PEG-Blocks für eine effektive Solubilisierung des Wirkstoffs B4A1 essentiell. Dies wurde bei Betrachtung der in Bezug auf den Polymeranteil kürzeren Konjugate ersichtlich. Während  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> noch eine gute Solubilisierung erreichte, konnte durch  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>0.85k</sub> keine Solubilisierung erzielt werden. Auch die Größe der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe wurde durch die Variation der PEG-Länge beeinflusst. Mit zunehmender Länge des Polymers bildeten sich größere Aggregatsysteme aus. So war insgesamt betrachtet das hauptsächlich in der Arbeit verwendete Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> am besten für weitere Anwendungen geeignet. Mit sehr guten Solubilisatoreigenschaften und relativ zu den anderen Konjugaten geringer Wirkstoff-Komplex-Größe waren für *in vitro* Biotests die besten Ergebnisse zu erwarten. Auch die Materialkosten fielen im Vergleich zum Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub> aufgrund der kürzeren Polymerlänge deutlich geringer aus.<sup>Text wurde aus [162] angepasst.</sup>

#### Modellierung der B4A1-Peptid-Wechselwirkungen

Alle synthetisierten B4A1-Konjugate konnten den potentiellen Wirkstoff erfolgreich in nahezu stöchiometrischen Wirkstoff:Solubilisator-Verhältnissen solubilisieren (**vgl. 3.2.1., Abschnitt 1**) und bildeten dabei kolloide Aggregate aus (**vgl. 3.2.1., Abschnitt 2**). Von großem Interesse war nun, erste Eindrücke der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und den Peptidsegmenten der Konjugate zu gewinnen. Um das generelle Konzept der spezifischen Wirkstoffbindung zu untersuchen, wurden exemplarisch für die B4A1-Konjugat-Komplexe Molekulardynamik-Simulationen (engl.: Molecular dynamic simulation, MD) in Zusammenarbeit mit A. Grafmüller (Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächen, Abteilung Theorie & Bio-Systeme, Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam, GER) für B4A1 und die jeweiligen Peptide angefertigt (**vgl. Exp. Teil**). Dazu wurden bei konstantem Druck und konstanter Temperatur die Dynamiken idealisierter 1:1-Komplexe (B4A1:Peptid) simuliert. Die Auswertung der Equilibrierung von je 20 verschiedenen Simulationen pro Peptid und deren anschließenden Durchlauf von 50 ns brachte aufschlussreiche Ergebnisse. Jedes der drei Peptide band klar erkennbar an den potentiellen Wirkstoff B4A1. Die resultierenden Wirkstoff-Konjugat-Komplexe waren sehr dynamisch und wiesen Wechselwirkungsenergien von ca.  $-200$  kJ/mol (B4A1/ $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ ),  $-150$  kJ/mol (B4A1/ $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ ) und  $-180$  kJ/mol (B4A1/ $\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$ ) auf.<sup>[8b, 8c]</sup>



**Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG:** Ein Vergleich der zwei Konjugate mit den höchsten gemessenen Wirkstoffkapazitäten zeigte, dass B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-Komplexe eine geringere Anzahl an energetisch gleichen Konformationen als die B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-Komplexe aufwies. Mithilfe repräsentativer Momentaufnahmen konnten zahlreiche intra- sowie intermolekulare Wechselwirkungen der Wirkstoff-Peptid-Bindung innerhalb der Simulationen visualisiert werden (**Abb. 31**). Neben Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Carboxylgruppen oder sekundären Aminen des Wirkstoffs und dem peptidischen Rückgrat traten  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen den Erwartungen entsprechend statistisch am häufigsten auf. So bildeten sich durchschnittlich 1.3  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Pep<sub>1</sub> und B4A1 aus. Neben  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen einer Aminobenzoesäuregruppe von B4A1 und einem der His-Reste traten die entstehenden  $\pi$ -Kontakte meist zwischen einem der beiden Phe-Reste und dem zentralen Pyrimidinring des Wirkstoffs auf. Dabei entfielen 80% der Kontakte auf parallele und 20% auf senkrechte, T-förmige  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen. In vielen Momentaufnahmen ragten Phe<sub>2</sub>, Lys<sub>5</sub>, Lys<sub>6</sub> und Lys<sub>7</sub> allerdings in das umgebende Lösungsmittel Wasser ohne Bindung zu B4A1. Möglicherweise lag hierin die geringere Wirkstoffkapazität im Vergleich zu Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> begründet.<sup>[8b, 8c]</sup>

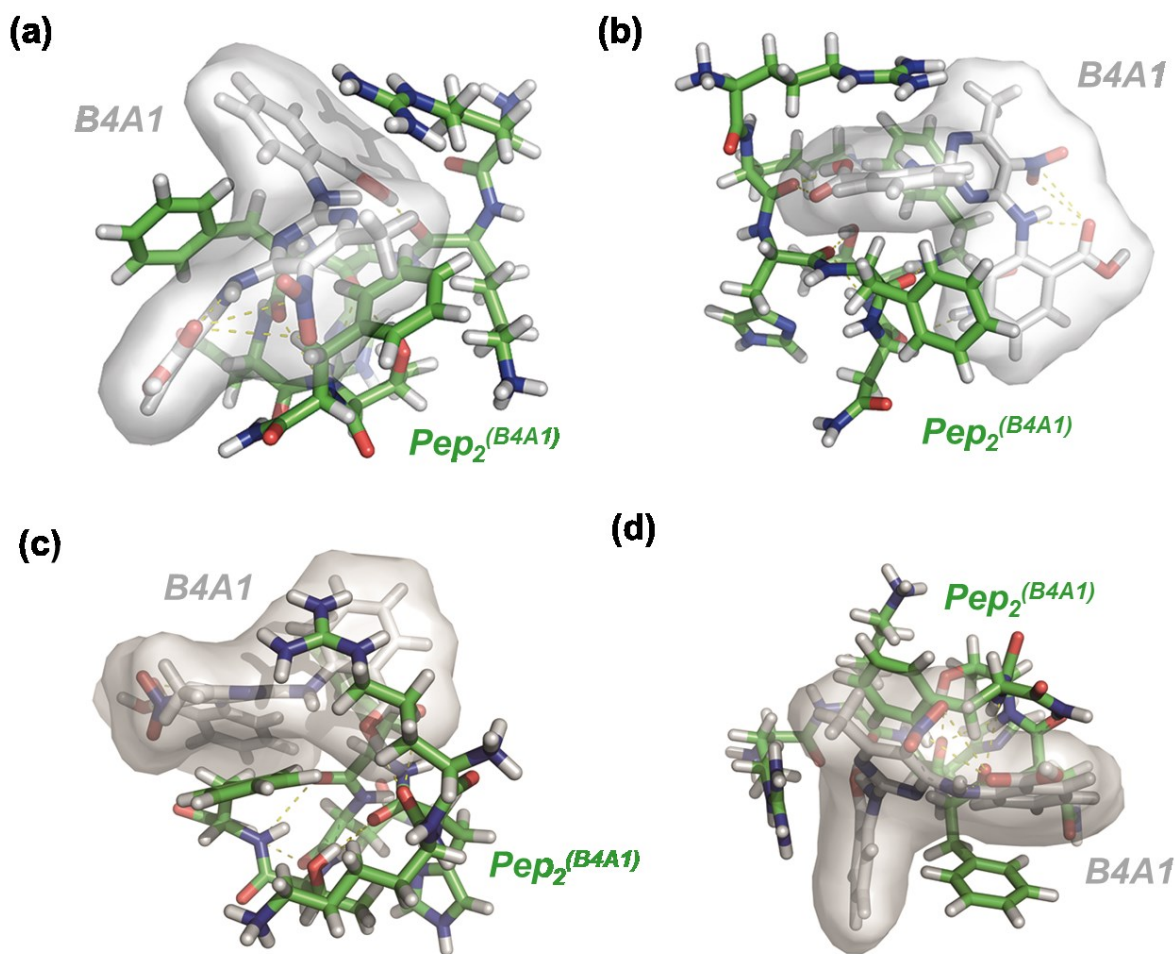


**Abb. 31.** MD-Simulationen der Bindungen zwischen der Peptidsequenz Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> (Stabmodell, Darstellung in grün) und B4A1 (van der Waals Oberfläche, Darstellung in grau) in Wasser. Die repräsentativen Momentaufnahmen zeigen idealisierte 1:1-Komplexe von B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> in der Seitenansicht (a,d) und Draufsicht (b,c). (Bedingungen: Temperatur = 310 K, Druck = 1 bar, Simulationsdauer = 50 ns nach der Equilibrierung).<sup>[8b, 8c]</sup>



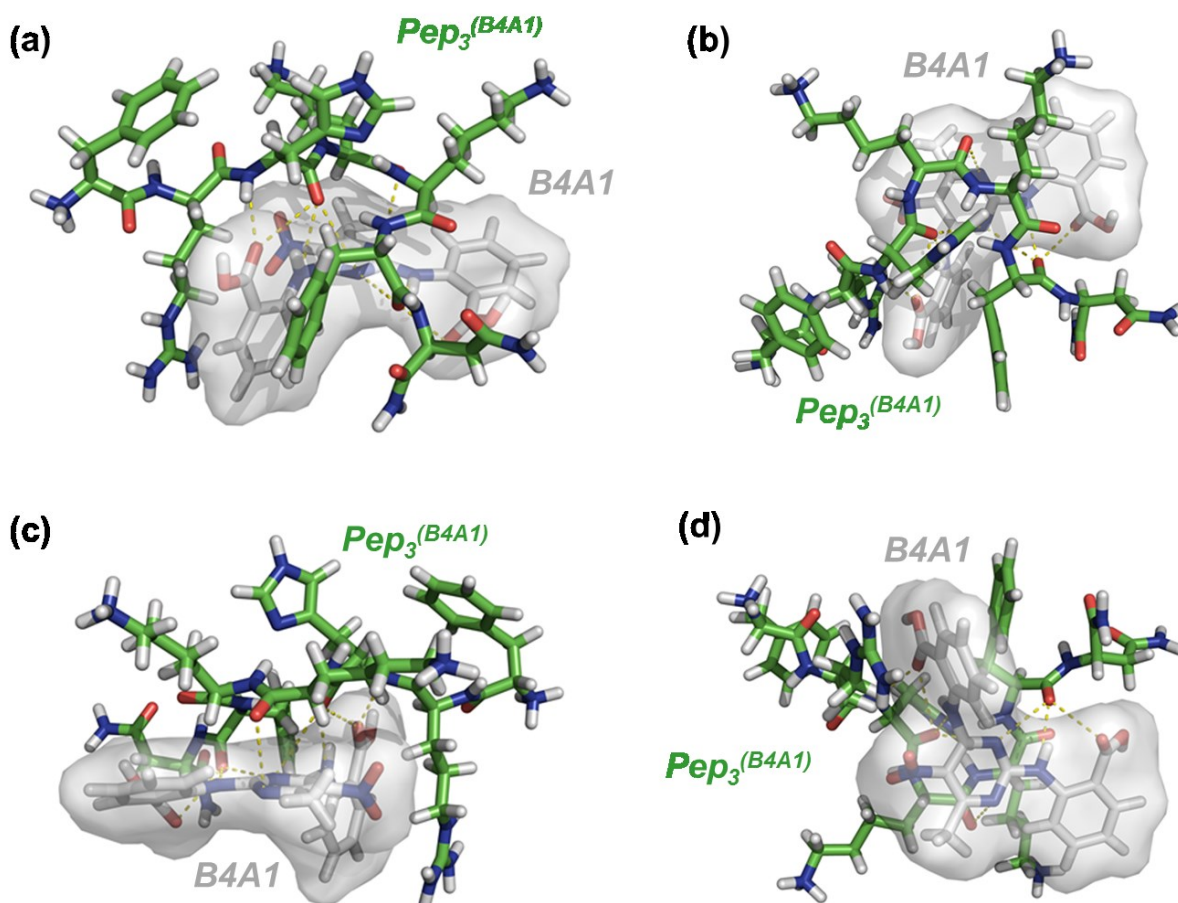
**Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG:** Zusätzlich zu den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptidrückgrat und den Carboxylgruppen von B4A1 sowie den Amid- und der Seitenkette von Thr<sub>6</sub> lagen auch im System Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> hauptsächlich aromatische Wechselwirkungen mit durchschnittlich 1.4  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen B4A1 und Peptid vor. Die Bindung des Wirkstoffs erfolgte damit etwas effektiver als bei Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> – vermutlich da die beiden Phe nicht als Dyade, sondern getrennt durch die polaren Aminosäuren Asn<sub>5</sub> und Thr<sub>6</sub> vorlagen. Dadurch sollte ein höherer Freiheitsgrad an Konformationen für die Phe-Reste in diesem Wirkstoff-Peptid-System möglich sein. Auch im System B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> kam es zur Ausbildung von  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen der Pyrimidineinheit von B4A1 und einem Phe-Rest. Hierbei entfielen 65-75% auf parallele und 25-35% auf senkrechte Wechselwirkungen. So umgaben z. B. Phe<sub>4</sub> und Arg<sub>1</sub> in der abgebildeten Konformation eine Aminobenzoesäureeinheit. Dabei kam es zur Ausbildung von Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen und T-förmigen  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen (**Abb. 32a,b**).

Dadurch, dass Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> weniger blockartig als Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> aufgebaut ist, waren zusätzliche Freiheitsgrade im Peptid möglich – zum einen durch die Trennung von Arg<sub>1</sub> und Phe<sub>4</sub> durch Lys<sub>2</sub> und His<sub>3</sub>, zum anderen durch die Trennung der zwei Phe-Reste durch die polaren Aminosäuren Asn und Thr. Auf diese Weise wurde eine dynamischere Bildung des Wirkstoff-Transporter-Komplexes durch Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> ermöglicht (**Abb. 32**). Im Gegensatz dazu führte die blockartige Aufreihung kationischer und aromatischer Aminosäuren in Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> offenbar zu einer weniger effizienten Wirkstoffbindung. Die realen Beobachtungen der Wirkstoff-solubilisierungs-Experimente zeigten, dass Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG eine etwas geringere Wirkstoffkapazität als Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG aufwies, was durch die vorliegenden Simulationen trotz des modellartigen Charakters bestätigt werden konnte. Demzufolge lagen die berechneten Wechselwirkungen wahrscheinlich auch in den real vorliegenden B4A1-Konjugat-Komplexen vor.<sup>[8b, 8c]</sup>



**Abb. 32.** Repräsentativen Momentaufnahmen von MD-Simulationen der Bindungen zwischen der Peptidsequenz  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  (Stabmodell, Darstellung in grün) und B4A1 (van der Waals Oberfläche, Darstellung in grau) in Wasser. Die idealisierten 1:1-Komplexe von B4A1/ $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  wurden in der Seitenansicht (a,c,d) und Draufsicht (b) abgebildet. (Bedingungen: Temperatur = 310 K, Druck = 1 bar, Simulationsdauer = 50 ns nach der Equilibrierung).<sup>[8b, 8c]</sup>

**$\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$ -PEG:** Das System  $\text{B4A1}/\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$  zeigte in den Beladungsexperimenten der B4A1-zugehörigen Konjugate die geringste Wirkstoffkapazität. Interessanterweise befand sich die Wechselwirkungsenergie von  $\text{B4A1}/\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$  gemäß der Simulationen zwischen denen der Systeme  $\text{B4A1}/\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$  und  $\text{B4A1}/\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  – ein scheinbarer Widerspruch zu den realen Solubilisierungsexperimenten. Eine Erklärung hierfür wäre, dass für  $\text{B4A1}/\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$  durchschnittlich nur 1.0  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen berechnet wurden. In **Abb. 33** ist erkennbar, dass diese Hauptwechselwirkung von Wirkstoff und Peptid zwischen  $\text{Arg}_2$  und  $\text{Phe}_6$  auftrat. Bei diesem Kontakt ergab sich jedoch eine weniger starke Wechselwirkung als bei  $\text{B4A1}/\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$  und  $\text{B4A1}/\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ , da die parallele  $\pi\pi$ -Wechselwirkung oftmals leicht verschoben und dementsprechend schwächer war.  $\text{Phe}_1$  schien zudem nicht an der B4A1-Bindung beteiligt zu sein, da es von B4A1 weg in das umgebende Lösungsmittel deutete.<sup>[8b, 8c]</sup>



**Abb. 33.** Repräsentative Momentaufnahmen von Simulationen idealisierter 1:1-Komplexe von B4A1/ $\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$  in der Seitenansicht (a,c) und Draufsicht (b,d). Die Abbildung der Peptidsequenz  $\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$  erfolgte als Stabmodell (Darstellung in grün) und die Abbildung von B4A1 als van der Waals Oberfläche (Darstellung in grau). (Bedingungen: Temperatur = 310 K, Druck = 1 bar, Simulationsdauer = 50 ns nach der Equilibrierung in Wasser).<sup>[8b, 8c]</sup>

Insgesamt konnten für alle drei B4A1-Peptid-Komplexe spezifische Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich in Abhängigkeit von den verschiedenen Peptidsequenzen. So variierten die Häufigkeit, Stärke und Positionen der  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen in den Komplexen und auch die Wechselwirkungsenergien reichten von  $-150$  kJ/mol bis  $-200$  kJ/mol. Damit zeigte sich, dass unterschiedliche Peptidsequenzen Auswirkungen auf die Stärke und Dynamik der B4A1-Bindung hatten.

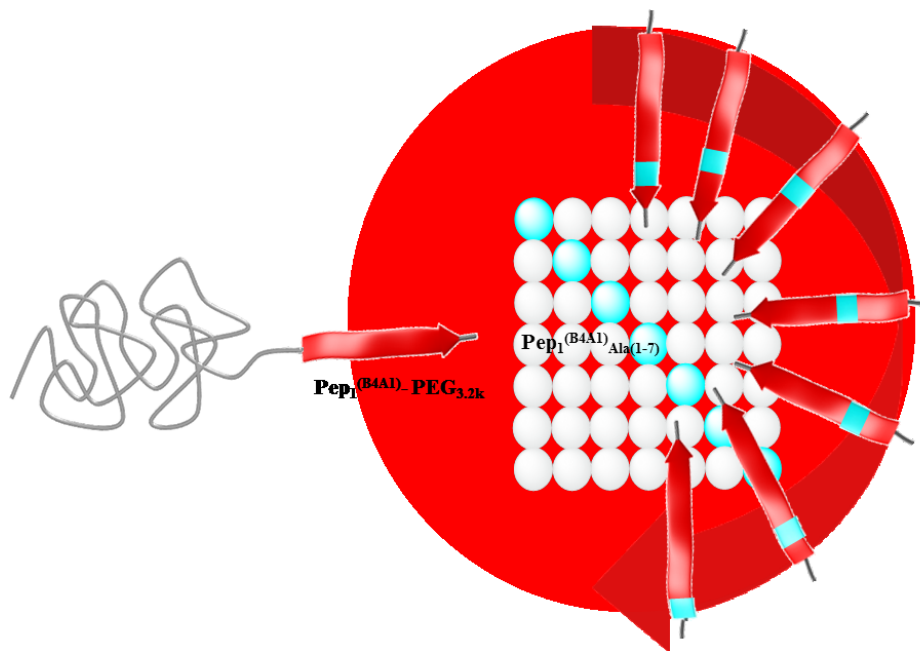
#### Untersuchung der Spezifität der Peptidsequenz der Konjugate gegenüber B4A1

Zur Vervollständigung der Charakterisierung der B4A1-Konjugat-Komplexe sollte im Folgenden untersucht werden, wie sich die einzelnen Aminosäuren in den Peptiden der Konjugate auf die Solubilisatorkapazitäten auswirkten. Außerdem sollten die Ergebnisse der idealisierten Simulationen der Komplexe (vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 4) mit realen Solubilisierungsversuchen verglichen werden. Dazu wurden exemplarisch für das System

B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG ein Alanin- und Serinscan und für B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG ein Alaninscan durchgeführt. Jede einzelne Aminosäureposition der Konjugate wurde hierbei systematisch durch einen Aminosäurerest mit geringer Funktionalität – Ala, bzw. Ser – ausgetauscht. Pro Scan erfolgte die Synthese von sieben Konjugaten, bei der an jeder der sieben ursprünglichen Positionen im Peptid von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> bzw. Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> die jeweilige Aminosäure durch ein Ala oder Ser ersetzt wurde (**Abb. 34**).

Es wurden die Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala(1-7)</sub>-PEG<sub>3.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser(1-7)</sub>-PEG<sub>3.2k</sub> und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala(1-7)</sub>-PEG<sub>3.2k</sub> erhalten (**vgl. Exp. Teil**). Die Konjugate wurden anschließend nach der forcierten Beladungsmethode mit B4A1 inkubiert und die maximale Beladungskapazität mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt (**vgl. Exp. Teil**). Abschließend erfolgte der Vergleich der Solubilisatorkapazitäten der ursprünglichen mit den modifizierten Löslichkeitsvermittlern.

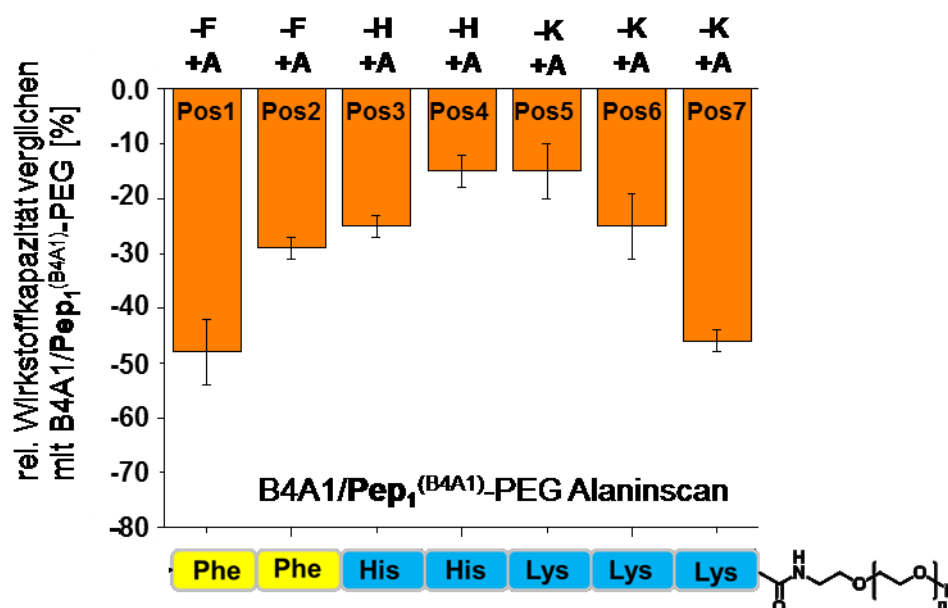
Ein An- oder Abstieg der Solubilisatorkapazität eines durch Ala oder Ser modifizierten Konjugats verglichen mit dem originalen Konjugat war maßgebend für die Bedeutung dieser Aminosäureposition im Peptid. Eine gleichbleibende oder höhere Beladung verglichen mit dem ursprünglichen Konjugat zeigte, dass diese Position im Originalpeptid an einer Wirkstoffbindung nicht bzw. nur geringfügig beteiligt war. Durch Ersatz dieser Aminosäure durch ein Ala oder Ser konnte eine effektivere Wirkstoffbindung erfolgen. Eine Abnahme der Kapazität wiederum deutete auf die aktive Teilnahme der Aminosäure dieser Peptidposition an der Wirkstoffbindung hin, da ein Austausch besagter Aminosäure durch ein Ala oder Ser eine geringere Wirkstoffkapazität mit sich brachte.



**Abb. 34.** Schematische Übersicht der Alternierung der Peptidsequenz von B4A1-affinen Konjugaten am Beispiel des Alaninscans von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub>. Die Alternierungen wurden ebenfalls im Serinscan von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und im Alaninscan von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> durchgeführt.<sup>[162]</sup>

Für alle drei Scans der Systeme B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG führte der Ersatz jeder Aminosäureposition im Peptid durch Ala oder Ser zu einer Abnahme der Wirkstoffkapazität. Demzufolge wiesen die Peptide eine hohe Affinität zum potentiellen Wirkstoff B4A1 auf, da jede der im Peptid enthaltenen Aminosäuren direkt oder indirekt an der Wirkstoffbindung und Komplexstabilisierung beteiligt zu sein schien. Text wurde aus [162] angepasst.

Die stärksten Abnahmen der Beladungskapazitäten der Konjugate des Alaninscans im Vergleich zu Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG waren für den Austausch von Phe<sub>1</sub>, Phe<sub>2</sub> und Lys<sub>7</sub> durch Ala erkennbar. So wurde für den Ersatz von Phe<sub>1</sub> eine Abnahme um 48% (molares Verhältnis = 0.43 B4A1/Konjugat), für Phe<sub>2</sub> eine Abnahme um 29% (molares Verhältnis = 0.59 B4A1/Konjugat) und für Lys<sub>7</sub> eine Abnahme um 46% (molares Verhältnis = 0.45 B4A1/Konjugat) ermittelt (**Abb. 35**). Offenbar traten, wie in den Simulationen der 1:1-B4A1/Peptid-Komplexe vorhergesagt, hauptsächlich  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Phe<sub>1</sub>, Phe<sub>2</sub> und B4A1 auf (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abb. 31**). Da Phe<sub>1</sub> einen weitaus größeren Einfluss auf die B4A1-Bindung als Phe<sub>2</sub> zu haben schien, wurde hiermit das Konzept der spezifischen Wirkstoffbindung unterstrichen, da offenbar nicht nur die Art der Aminosäure, sondern auch deren Position im Gesamtpeptid von Bedeutung war. Das traf ebenfalls für den Ersatz von Lys<sub>7</sub> durch Ala zu, da bei den anderen basischen Aminosäuren His<sub>3</sub>, His<sub>4</sub>, Lys<sub>5</sub> und Lys<sub>6</sub> kein starker Abfall der Wirkstoffkapazität beobachtet werden konnte. Während Lys<sub>7</sub> laut der Simulation kaum an der B4A1-Bindung beteiligt war, lag im realen Komplex wahrscheinlich kein idealisiertes 1:1-B4A1/Konjugat-Verhältnis vor. Somit waren auch intermolekulare Wechselwirkungen, d. h. Wechselwirkungen von B4A1 mit mehreren Peptiden, denkbar. Auch die in den DLS-Messungen nachgewiesenen Aggregate, die beim Solubilisierungsvorgang auftraten, sprachen für diese Überlegung (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 2**). In diesem Fall waren für die Verknüpfung zweier Peptide durch ein Wirkstoffmolekül womöglich vor allem die Randpositionen essentiell. Bei B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG war evtl. ein intermolekulares Lys<sub>7</sub>-Phe<sub>1</sub>-Segment zweier Peptide von zentraler Bedeutung für die effektive Bindung von B4A1. Ersetzte man eine dieser Aminosäuren durch Ala, sank die Kapazität deutlich, was in den Simulationen nicht zum Ausdruck kommen würde. Lys<sub>7</sub> könnte somit auch zur Steigerung der kolloiden Stabilität im Komplex beitragen, sodass ein größerer Anteil an B4A1 im Komplex gebunden werden konnte. Die anderen Positionen im Peptid Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG schienen einen weniger großen Einfluss auf die Wirkstoffbindung zu haben, da deren Ersatz durch Ala nur zu einer Abnahme um 25% (molares Verhältnis = 0.62 B4A1/Konjugat) für His<sub>3</sub> und um 15% (molares Verhältnis = 0.71 B4A1/Konjugat) für His<sub>4</sub> führte. Bei Ersatz von Lys<sub>5</sub> durch Ala ergab sich eine Kapazitätsabnahme um 15% (molares Verhältnis = 0.71 B4A1/Konjugat) und für Lys<sub>6</sub> eine Abnahme um 25% (molares Verhältnis = 0.62 B4A1/Konjugat) im Vergleich zum Konjugat Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (**Abb. 35**).<sup>[162]</sup>



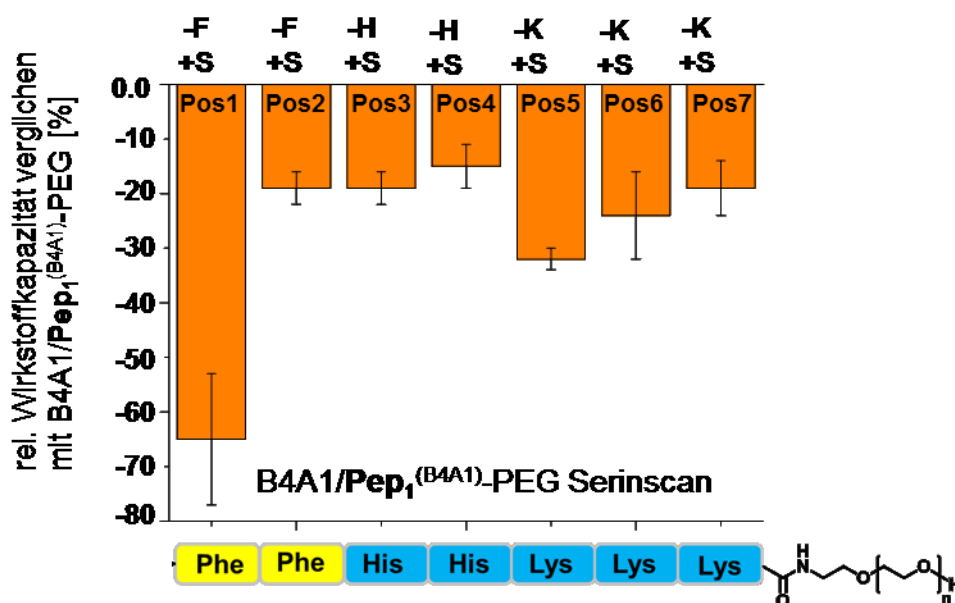
**Abb. 35.** Übersicht der B4A1-Kapazitäten der im Alaninscan modifizierten Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala}(1-7)}\text{-PEG}$  im Vergleich zum ursprünglichen Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$ . (Bedingungen: [Konjugate] = 2.44 mM, Raumtemperatur, pH = 7).<sup>[162]</sup>

Für das Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$  wurde zusätzlich ein Serinscan durchgeführt, um die Erkenntnisse über die Einflüsse, die die leicht hydrophobe Aminosäure Ala auf die Wirkstoffbindung hatte, durch die Wirkung der polaren Aminosäure Ser zu ergänzen (**Abb. 36**). Auch für den Serinscan ergab sich eine Abnahme der B4A1-Kapazität der durch Ser modifizierten Konjugate an jeder der sieben Peptidpositionen, wobei auch hier der größte Effekt für den Ersatz von  $\text{Phe}_1$  auftrat – eine Abnahme um 65% (molares Verhältnis = 0.29 B4A1/Konjugat) im Vergleich zu  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$ . Im Gegensatz zum Alaninscan wurde im Serinscan von  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$  für die Position  $\text{Lys}_5$  ein deutlicher Kapazitätsabfall von 33% (molares Verhältnis = 0.56 B4A1/Konjugat) beobachtet. Offenbar wurden durch das zusätzliche Ser, anders als bei der nicht polaren Aminosäure Ala, in der Peptidsequenz weitere Wasserstoffbrückenbildungen zwischen Peptid und potentiellm Wirkstoff möglich. Erstaunlich war, dass diese zusätzlichen Wechselwirkungen offenbar nur auf  $\text{Lys}_5$ , nicht aber auf die ebenfalls kationischen und benachbarten Aminosäuren  $\text{His}_4$  und  $\text{Lys}_6$  zutrafen. Der Ersatz der Peptidpositionen  $\text{Phe}_2$  und  $\text{Lys}_7$  im Alaninscan von  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$  führte zu starken Abnahmen der B4A1-Kapazität. Im Gegensatz dazu traten deutlich geringere Unterschiede der Solubilisatoreffizienz im Serinscan für diese Aminosäuren auf. Für beide Positionen ergaben sich Abnahmen der Kapazität um 19% (molares Verhältnis = 0.67 B4A1/Konjugat) im Vergleich zum ursprünglichen Konjugat.

Ebenso galt das auch für die Positionen  $\text{His}_3$  mit einer Abnahme der B4A1-Kapazität um 19% (molares Verhältnis = 0.67 B4A1/Konjugat) und  $\text{Lys}_6$  mit einer Abnahme der B4A1-Kapazität um 24% (molares Verhältnis = 0.63 B4A1/Konjugat). Das muss jedoch keineswegs bedeuten, dass diese Peptidpositionen in der Originalsequenz nur wenig an der Wirkstoffbindung beteiligt waren. Da Ala eine unpolare und Ser eine polare Aminosäure



darstellt, waren auch unterschiedliche Einflüsse der beiden Aminosäuren auf die Solubilisatoreffizienz der Konjugate zu erwarten. Der Einsatz von Ser könnte zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zu B4A1 ermöglichen, ein Umstand, der durch das unpolare Ala nicht zu erwarten war. Auf diese Weise könnte es dann nur zu geringen Kapazitätsunterschieden im Vergleich zum originalen Konjugat kommen. Auch der Umstand, dass im ursprünglichen Screening die Ser stark ähnelnde Aminosäure Thr als fünfthäufigste Aminosäure auftrat zeigte, dass die polaren Aminosäuren durchaus einen Einfluss auf die Wirkstoffbindung hatten.<sup>[162]</sup>

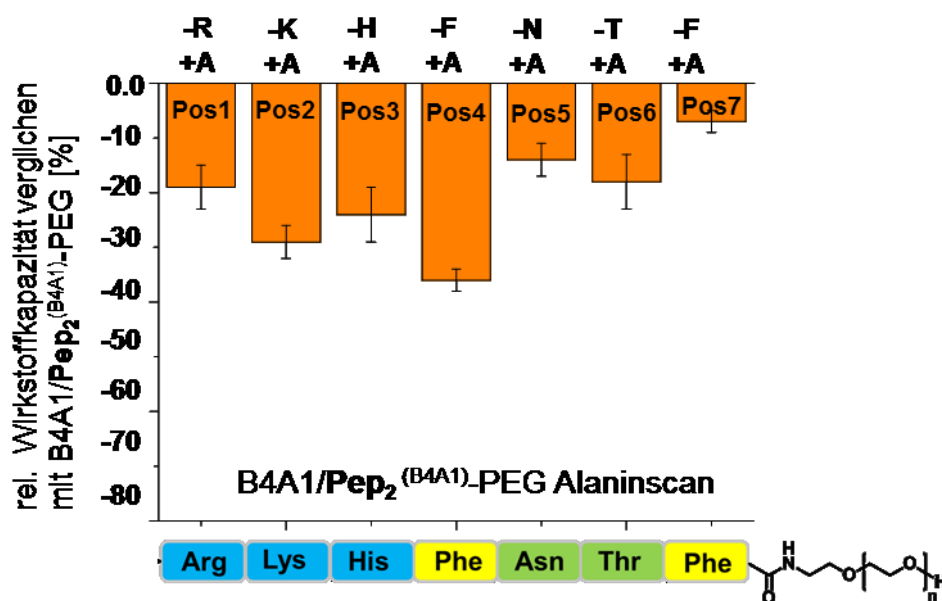


**Abb. 36.** Serinscan des Konjugats  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG. Dargestellt wurden die Solubilisatorkapazitäten der modifizierten Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser}(1-7)}$ -PEG im Vergleich zur Kapazität des ursprünglichen Konjugats  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG. (Bedingungen: [Konjugate] = 2.44 mM, Raumtemperatur, pH = 7).<sup>[162]</sup>

Für  $\text{B4A1}/\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG zeigte der Alaninscan, dass in diesem System eine komplexere Bindungssituation als bei  $\text{B4A1}/\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG vorlag. Da der Ersatz der Aminosäuren durch Ala in jeder Position zu einer starken Abnahme der B4A1-Kapazität führte, waren offenbar alle Aminosäurepositionen an der Wirkstoffbindung und Komplexstabilisierung beteiligt. Der größte Effekt war für den Austausch von  $\text{Phe}_4$  durch Ala zu erkennen. Er führte zu einer Abnahme der B4A1-Kapazität um 36% (molares Verhältnis = 0.53 B4A1/Konjugat) bezogen auf das ursprüngliche Konjugat  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG. Demzufolge schien  $\text{Phe}_4$  von enormer Bedeutung für die Wirkstoffbindung zu sein, wie in den Simulationen vorhergesagt (vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 4).<sup>[8b, 8c]</sup> Unerwarteterweise führte der Austausch von  $\text{Phe}_7$  lediglich zu einer Abnahme der B4A1-Kapazität um 7% (molares Verhältnis = 0.77 B4A1/Konjugat) verglichen mit dem Originalkonjugat. Ala schien in der Position sieben im Austausch mit Phe gut an den potentiellen Wirkstoff zu binden, potentiell in Kombination mit der benachbarten Aminosäure  $\text{Thr}_6$ . Möglicherweise war das Peptid  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala7}}$ -PEG fähig, sich in seiner Konformation hinreichend zu reorientieren, sodass der Austausch von

Phe<sub>7</sub> durch Ala sehr gut ausgeglichen werden konnte. Das würde ausgezeichnet mit den Simulationen übereinstimmen, die eine besonders hohe Anzahl von Konformationen ähnlicher Energie für den hochdynamischen Komplex B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG vorhersagten.<sup>[8b, 8c]</sup>

Zusätzlich zu den vorherrschenden  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Phe<sub>4</sub> und B4A1 schienen auch Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen und  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen mit den basischen Aminosäuren Arg<sub>1</sub>, Lys<sub>2</sub> und His<sub>3</sub> im Komplex eingegangen zu werden. Der Ersatz dieser Aminosäurepositionen durch Alanin führte zur Abnahmen der B4A1-Kapazität um 19% (molares Verhältnis = 0.67 B4A1/Konjugat) für Arg<sub>1</sub>, um 29% (molares Verhältnis = 0.59 x B4A1/Konjugat) für Lys<sub>2</sub> und um 24% (molares Verhältnis = 0.63 B4A1/Konjugat) für His<sub>3</sub> im Vergleich zum ursprünglichen Konjugat Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG. Auch der polare Block zwischen Phe<sub>4</sub> und Phe<sub>7</sub> erwies sich für die B4A1-Bindung von Bedeutung. Es ergaben sich Kapazitätsabnahmen von 14% (molares Verhältnis = 0.71 B4A1/Konjugat) für Asn<sub>5</sub> und 18% (molares Verhältnis = 0.67 x B4A1/Konjugat) für Thr<sub>6</sub> verglichen mit Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG. Interessanterweise wurden auch in den Simulationen Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Thr<sub>6</sub> und dem peptidischen Rückgrat vorhergesagt, sodass auch hier deutliche Übereinstimmungen mit dem realen Komplex vorzuliegen schienen (**Abb. 37**).<sup>[162]</sup>



**Abb. 37.** Übersicht der Wirkstoffkapazitäten der Konjugate Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala(1-7)</sub>-PEG. Die Effizienz der B4A1-Solubilisierung wurde mit der des ursprünglichen Konjugats Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG verglichen. (Bedingungen: [Konjugate] = 2.44 mM, Raumtemperatur, pH = 7).<sup>[162]</sup>

Insgesamt konnten die komplexen B4A1-Konjugat-Systeme umfangreich analysiert werden. Es wurde ersichtlich, dass für eine gute Solubilisatorkapazität vor allem die Peptidsequenz des Konjugats eine große Rolle spielt. Die Peptide der synthetisierten Konjugate Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG waren hauptsächlich aromatischer und basischer Natur, sodass diese Arten von Aminosäuren offenbar zur erfolgreichen Wirkstoffbindung notwendig sind. Im Rahmen von Alanin- und Serinscans konnten die Spezifitäten der B4A1-Peptid-Wechselwirkungen für



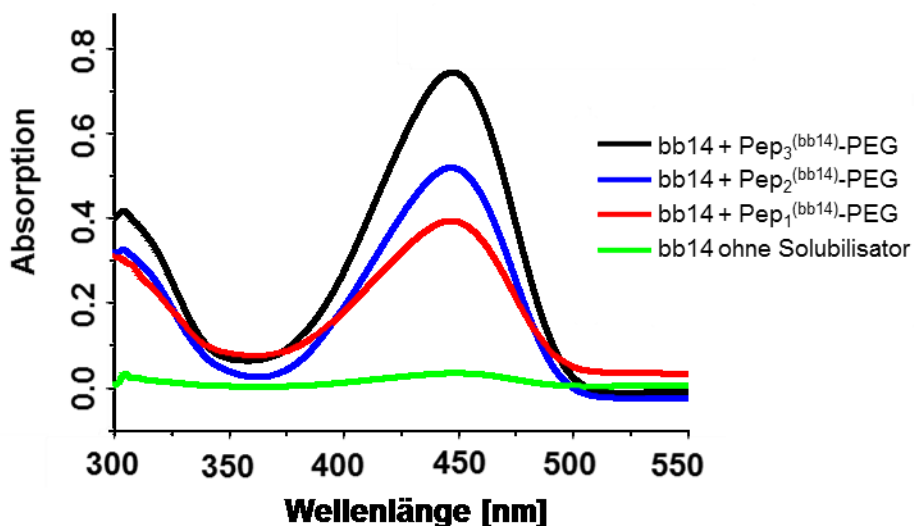
die einzelnen Aminosäurepositionen bewiesen werden. Hinsichtlich der Größe bewegten sich die kolloiden Aggregate der Komplexe im Bereich  $R_h = 100\text{--}175\text{ nm}$ , was auf eine eher dynamische Anordnung der Moleküle im Gesamtkomplex schließen ließ. Durch idealisierte Simulationen der Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen konnte diese Vermutung untermauert werden, ebenso wie durch die Variation der Größe des PEG-Segments der Konjugate.

### 3.2.2. Rhodanin bb14

#### Solubilisierung von bb14 durch maßgeschneiderte Peptid-PEG-Konjugate

Nach der sehr effizienten Solubilisierung des *N*-Phenylamins B4A1 durch Peptid-PEG-Konjugate (vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 1), war von großem Interesse, ob diese Form der Löslichkeitsvermittlung auch für Rhodanin-Derivate angewendet werden konnte. Zudem würde durch eine erfolgreiche Solubilisierung das Konzept zur Identifikation von Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffkapazität durch Raman-Mikroskopie bestätigt. Dieses wurde am Beispiel von B4A1 entwickelt und auf den Wirkstoff bb14 angewendet.

Die für bb14 in Kapitel 3.1.6. ausgewählten, strukturell ähnlichen Peptidsequenzen wurden als Peptid-PEG-Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb14})}$ -PEG synthetisiert und nach der forcierten Beladungsmethode behandelt (vgl. Exp. Teil). Mit konstanten Wirkstoff- und Konjugatkonzentrationen von je 2.21 mM in DMSO, bzw. Wasser wurden die Substanzen miteinander versetzt. Die gefriergetrockneten, in Wasser resolubilierten Rückstände wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bei 451 nm analysiert und die maximalen Beladungskapazitäten der Konjugate in der wässrigen Lösung ermittelt (Abb. 38).



**Abb. 38.** Solubilisierung des potentiellen Wirkstoffs bb14 durch maßgeschneiderte Peptid-PEG-Konjugate. Übersicht der UV/Vis-Absorptionsspektren der Komplexsysteme  $\text{bb14}/\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb14})}$ -PEG und von bb14 ohne Zusatz eines Löslichkeitvermittlers. Die Darstellung zeigt die maximalen Wirkstoffkapazitäten der Konjugate bei einer festen Konjugatkonzentration. (Bedingungen: [Konjugate] = 2.21 mM, Raumtemperatur, pH = 7, Verdünnung 1:10).<sup>[8b, 8c]</sup>

Ohne Zusatz eines Formulierungsadditivs zeigte bb14 eine schlechte Wasserlöslichkeit auf. Im Gegensatz dazu ermöglichte jedes der drei Konjugate eine gute Solubilisierung von bb14. So konnte mit  $\text{Pep}_1^{(\text{bb14})}$ -PEG ein molares Verhältnis 1:22.2 (bb14/Konjugat), mit  $\text{Pep}_2^{(\text{bb14})}$ -PEG ein molares Verhältnis von 1:16.6 (bb14/Konjugat) und mit  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG ein molares Verhältnis von 1:11.6 (bb14/Konjugat) erreicht werden. Dies entspricht 0.6 Gew.-% an bb14 im Komplex bb14/ $\text{Pep}_1^{(\text{bb14})}$ -PEG, 0.7 Gew.-% an bb14 im Komplex bb14/ $\text{Pep}_2^{(\text{bb14})}$ -PEG und 1.0 Gew.-% an bb14 im Komplex bb14/ $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG. Damit ist der Wirkstoffanteil in den Gesamtkomplexen im Vergleich zum allgemein anerkannten Gew.-%-Anteil für Formulierungsadditive noch relativ gering.<sup>[159]</sup> Die Peptid-PEG-Konjugat-Systeme zeichnen sich jedoch vor allem durch ihre maßgeschneiderten Peptidsequenzen aus. Diese sollen eine gezielte und schnelle Wirkstofffreisetzung ermöglichen, die im Fall von unspezifisch bindenden Additiven wie Pluronic<sup>®</sup> oft nicht möglich sind.<sup>[108]</sup> Zudem könnten durch Modifikation der Transporter-Systeme vermutlich höhere Wirkstoffbeladungen erzielt werden.

Die Beladungskapazitäten standen im Zusammenhang mit den Peptidsequenzen der Konjugate. Wahrscheinlich waren  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen vorherrschend, die sich zwischen den in jedem der drei Konjugate enthaltenen zwei Phe-Resten und bb14 ausbildeten. Auch die zwei jeweils auftretenden polaren Aminosäuren schienen für die Wirkstoffsolubilisierung von Bedeutung zu sein. Da  $\text{Pep}_1^{(\text{bb14})}$ -PEG die geringste Wirkstoffkapazität aufwies, lag die Vermutung nahe, dass die Separation der zwei Phe-Reste durch vier weitere Aminosäuren hierfür verantwortlich war, weil  $\text{Pep}_2^{(\text{bb14})}$ -PEG und  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG jeweils Phe-Phe-Dyaden aufweisen. Außerdem schien das Segment Phe-Phe-Gln wichtig für die Solubilisierung von bb14 zu sein, da es sowohl in  $\text{Pep}_2^{(\text{bb14})}$ -PEG als auch in  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG auftrat (**vgl. Kapitel 3.1.4., Tab. 2**).<sup>[8b, 8c]</sup>

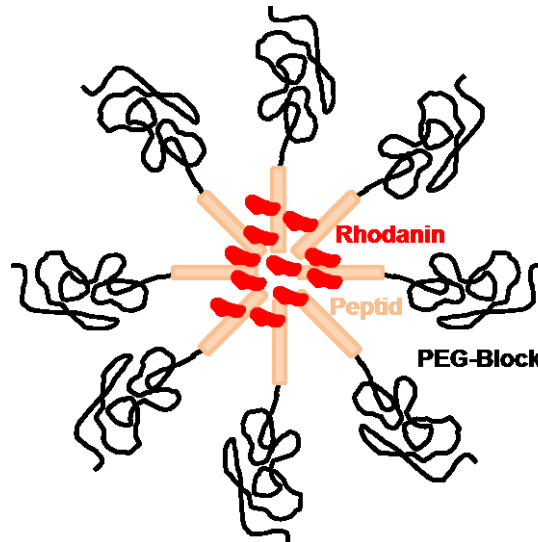
Zusammenfassend konnte eine erfolgreiche Solubilisierung von bb14 durch drei ausgewählte Peptid-PEG-Konjugate erfolgen. Die molaren Wirkstoff:Solubilisator-Verhältnisse fielen geringer als die in den B4A1-Komplexen auftretenden aus (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 1**). Wahrscheinlich spielten hierfür die Auswahlkriterien für positive Treffer in der Raman-Screeningprozedur eine Rolle. Offenbar konnte die Identifizierung B4A1-zugehöriger Sequenzen spezifischer erfolgen, da alle B4A1-Konjugate eine höhere Wirkstoffkapazität aufwiesen als Konjugate mit bb14-Anreicherung. Hierbei könnten die Wahl des wirkstoffspezifischen Peakbereichs und die Grenzensetzung der Höhe des Raman-Signals als Kriterien entscheidend gewesen sein (**vgl. Kapitel 3.1.4., Abschnitt 1**).

### Ermittlung der hydrodynamischen Radien der bb14-Komplexe

Weiterführende Untersuchungen der bb14-Konjugat-Komplexe erfolgten durch DLS-Experimente. Die unbeladenen Konjugate bildeten erneut keine kolloiden Aggregate in wässriger Lösung. Für alle Wirkstoff-Konjugat-Komplexe hingegen konnten  $R_h$  ermittelt werden. So ergab sich für das System bb14/ $\text{Pep}_1^{(\text{bb14})}$ -PEG ein  $R_h$  von 70 nm, für bb14/ $\text{Pep}_2^{(\text{bb14})}$ -PEG ein  $R_h = 62$  nm und für bb14/ $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG ein  $R_h = 61$  nm.

Da die  $R_h$  der bb14-Komplexe deutlich kleinere Werte als die der B4A1-Komplexe aufwiesen (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 2**), wäre es denkbar, dass hier eine andere Form der Aggregation und Komplexbildung zugrundelag. Möglicherweise bildeten sich aufgrund der höheren Hydrophobie des Wirkstoffs bb14, verglichen mit B4A1, starrere und kompaktere

Komplexsysteme aus (**Abb. 39**). So könnten die hydrophilen PEG-Blöcke in den Rhodanin-Wirkstoff-Komplexen vermutlich nach außen ragen und die im Inneren liegenden Wirkstoff- und Peptidmoleküle wirksam gegen das wässrige Medium abschirmen. Verglichen mit den B4A1-Komplexen wären so die Positionen der PEG-Blöcke, Peptide und Wirkstoffmoleküle in einer geordneten Struktur vermutlich strenger vorgegeben und die Systeme definierter und kompakter.



**Abb. 39.** Mögliches Modell der Rhodanin-Konjugat-Komplexe. Aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften des Wirkstoffs bb14 (Darstellung in rot) und der zugehörigen Peptidsequenzen (Darstellung in orange) ist ein eher starrer und mizellenartiger Aufbau der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe denkbar. Dabei befänden sich die Wirkstoff- und Peptidmoleküle im Innern, abgeschirmt durch die PEG-Blöcke (Darstellung in schwarz), die nach außen in das wässrige Medium ragen würden.

Insgesamt konnten für alle bb14-Konjugat-Systeme erfolgreiche Solubilisierungen nachgewiesen werden. Die Größe der komplexen Aggregate fiel insgesamt deutlich kleiner als die der B4A1-Komplexe aus. Daraus ließ sich auf einen unterschiedlichen Aufbau der Aggregate schließen. Gründe hierfür waren möglicherweise in den unterschiedlichen Polaritäten der Wirkstoffe und Peptidsequenzen zu suchen.

#### 3.2.3. Rhodanin bb17

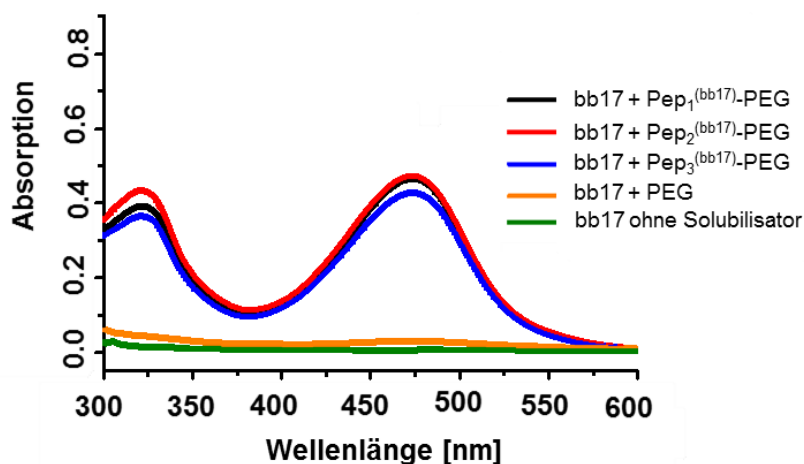
##### Solubilisierung von bb17 durch Peptid-PEG-Konjugate

Für die Wirkstoffe B4A1 und bb14 wurden im Rahmen eines Raman-Mikroskopie-basierten Screenings Peptidsequenzen mit hoher Wirkstoffanreicherung identifiziert (vgl. **Kapitel 3.1.4.**) und die zugehörigen Konjugate mit den Wirkstoffen beladen (vgl. **Kapitel 3.2.1., Abschnitt 1** und **Kapitel 3.2.2., Abschnitt 1**). Im Gegensatz dazu wurden Peptidbibliotheken auf ihre Anreicherung an bb17 und bb15 mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopie-basierten Screenings untersucht (vgl. **Kapitel 3.1.5.**). Von

Interesse war nun, ob die auf Grundlage dieser zweiten Methode synthetisierten Peptid-PEG-Konjugate ebenfalls eine gute Wirkstoffbeladung aufwiesen.

Alle potentiell bb17-affinen Peptid-PEG-Konjugate wurden nach der etablierten forcierten Beladungsmethode bei konstanter Konjugat- und Wirkstoffkonzentration (2.07 mM) mit dem potentiellen Wirkstoff beladen (**vgl. Exp. Teil**). Mittels UV/Vis-Messungen bei 473 nm konnten gute maximale Beladungskapazitäten nachgewiesen werden (**Abb. 40**), während bb17 durch Solubilisierung mit PEG oder ohne Zusatz eines Solubilisators eine schlechte Wasserlöslichkeit aufwies.<sup>[153]</sup>

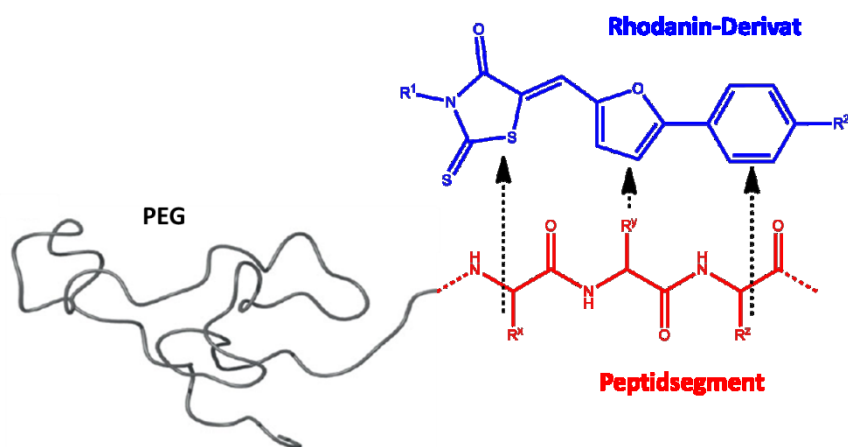
Die Löslichkeitsvermittler  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb17})}$ -PEG zeigten sehr ähnliche Beladungskapazitäten mit molaren Verhältnissen (bb17/Konjugat) von 1:8.3, 1:8.8, bzw. 1:8.9. Die entsprechenden Angaben in Gew.-% betragen 1.4 Gew.-% an bb17 im Komplex bb17/ $\text{Pep}_1^{(\text{bb17})}$ -PEG, 1.3 Gew.-% an bb17 im Komplex bb17/ $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG und 1.3 Gew.-% an bb17 im Komplex bb17/ $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG. Verglichen mit den normalerweise angestrebten Werten von 5-25 Gew.-% ist der Gewichtsanteil von bb17 in den Komplexen noch relativ gering.<sup>[159]</sup> Die gute Spezifität der Konjugate machte diese Werte jedoch wahrscheinlich vertretbar.



**Abb. 40.** Abbildung der UV/Vis-Absorptionsspektren der Komplexsysteme bb17/ $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb17})}$ -PEG. Die maximalen Wirkstoffkapazitäten der Konjugate wurden im Vergleich zur Solubilisierung von bb14 mit PEG, bzw. ohne Zusatz eines Solubilisators abgebildet. (Bedingungen: [Konjugate; PEG] = 2.07 mM, Raumtemperatur, pH = 7, Verdünnung 1:20).<sup>[153]</sup>

Die verschiedenen Peptidsequenzen im Fall der bb17-zugehörigen Konjugate resultierten offenbar nicht in stark unterschiedlichen Wirkstoffkapazitäten. Möglicherweise erfolgte die Bindung des Wirkstoffs hauptsächlich durch ein Dreier-Aminosäuresegment, das aus zwei aromatischen Aminosäureresten und einem polaren Aminosäurerest bestand. Diese FFS- oder FFQ-Segmente traten in dem Screening für Peptidsequenzen mit hoher bb17-Kapazität häufig auf (**vgl. Kapitel 3.1.5., Tab. 3**). Sie fanden sich auch in den Peptiden der synthetisierten Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{bb17})}$ -PEG,  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG und  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG mit den Peptidsequenzen SFFSFFQ, SFFEFFQ und FFQKQQG wieder. So könnten bezüglich der Größenordnung z. B. die Rhodanin-, Furan- und Phenyleinheiten von bb17 mit drei aneinandergrenzenden Seitenfunktionalitäten des Peptidsegments wechselwirken (**Abb. 41**). Diese drei Aminosäuren könnten hauptsächlich FFS- oder FFQ-Einheiten darstellen und zu

einer effektiven Wirkstoffbindung führen. In dem Fall wären evtl. die anderen im Peptid vorkommenden Aminosäuren für die bb17-Bindung weniger essentiell. Das könnte sich wiederum in ähnlichen Wirkstoffkapazitäten der drei Konjugate widerspiegeln.



**Abb. 41.** Modell der Anordnung von Rhodanin- und Peptidsegment im Wirkstoff-Konjugat-Komplex. In Bezug auf die Größenordnung könnten die Wechselwirkungen zwischen dem Rhodanin-, Furan- und Phenylteil des Wirkstoffs und drei aneinandergrenzenden Aminosäuren im Peptid auftreten.

Insgesamt konnten gute Wirkstoffkapazitäten für die Beladung der bb17-zugehörigen Konjugate erhalten werden. In Abhängigkeit von der Peptidstruktur konnten in diesem Fall kaum Unterschiede festgestellt werden. Dies könnte aus einem in allen drei Peptiden gemeinsam enthaltenen Strukturelement resultieren, das die restlichen Aminosäuren im Peptid für die bb17-Bindung weniger essentiell werden lässt.

#### Ermittlung der hydrodynamischen Radien der bb17-Komplexe

Auch bei der Beladung der Konjugate des bb17-Screenings konnte eine wirkstoffinduzierte Aggregation mittels DLS nachgewiesen werden. Das System bb17/Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG wies einen R<sub>h</sub> von 56 nm, bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG einen R<sub>h</sub> = 71 nm, und bb17/Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG einen R<sub>h</sub> = 55 nm auf. Verglichen mit den B4A1-Komplexen lagen deutlich kleinere kolloide Aggregate vor, die mit einer Größe von ca. 100 nm gut für den Transport im Blut geeignet wären.<sup>[4]</sup> Möglicherweise bildeten die bb17-Komplexe wie für die bb14-Komplexe vorgeschlagen (vgl. Kapitel 3.2.2., Abb. 39) kompaktere Strukturen aus, da die Strukturen der stark hydrophoben und schlecht wasserlöslichen Rhodanine Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff- und Konjugatmolekülen an mehreren Stellen ermöglichten. Vor der Wirkstoffbeladung zeigten die Konjugate keine Aggregatbildung auf, sodass die Konjugate nach erfolgter Wirkstofffreisetzung vermutlich gut vom Körper abgebaut werden könnten.<sup>[153]</sup>

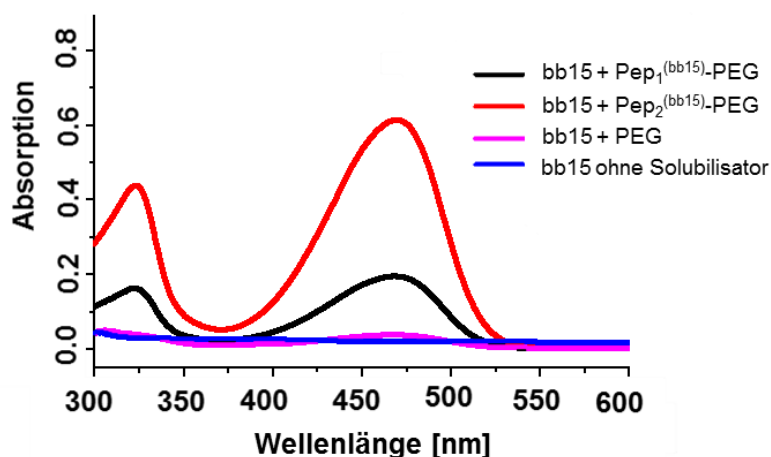
Allgemein konnten für die bb17-Konjugate etwas höhere Wirkstoffkapazitäten als in den bb14-Komplexen erhalten werden. Eine Abhängigkeit der Solubilisierungseffizienz von der Peptidsequenz lag in den bb17-Systemen scheinbar nicht für die kompletten Sequenzen vor. Die ermittelten R<sub>h</sub> der Aggregate befanden sich in der Größenordnung der bb14-Komplexe.

### 3.2.4. Rhodanin bb15

#### Solubilisierung von bb15 durch Peptid-PEG-Konjugate

Der potentielle Wirkstoff bb15 wies nur geringfügige, strukturelle Unterschiede im Vergleich zu bb14 und bb17 auf. Variationen traten lediglich im furanangrenzenden (Bi)arylteil der Rhodaninderivate auf (**vgl. Kapitel 3.1.1., Abb. 11**). Inwiefern sich dennoch Unterschiede im Solubilisierungsverhalten und der Größenverteilung der wirkstoffbeladenen Komplexe zeigten, sollte im Folgenden untersucht werden.

Die Solubilisierung von bb15 durch die Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG erfolgte ebenfalls nach der forcierten Beladungsprozedur bei konstanten Wirkstoff- und Konjugatkonzentrationen von 2.03 mM (**vgl. Exp. Teil**). Auch hier erfolgte die Bestimmung der maximalen Beladungskapazitäten mittels UV/Vis bei 469 nm (**Abb. 42**). Kontrollexperimente mit PEG oder ohne Zusatz eines Solubilisators resultierten in sehr geringeren Löslichkeiten von bb15. Im Gegensatz dazu zeigten die Löslichkeitsvermittler  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG in Abhängigkeit von der Peptidsequenz des jeweiligen Konjugats unterschiedliche molare Verhältnisse (bb15/Konjugat) von 0.05 und 0.18. Dies entspricht 0.7 Gew.-% an bb15 im Komplex bb15/ $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG und 2.3 Gew.-% an bb15 im Komplex bb15/ $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG. Durch Modifikation der Konjugate wäre es sinnvoll, die Gewichtsanteile im Gesamtkomplex noch etwas zu erhöhen, sodass in Anwendungen wie Biotests der Anteil an Konjugat so gering wie möglich gehalten werden kann.



**Abb. 42.** UV/Vis-Absorptionsspektren des Wirkstoffs bb15, solubilisiert durch die Konjugate  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{bb15})}$ -PEG, PEG oder ohne Zusatz eines Formulierungsadditivs. Die maximalen Wirkstoffkapazitäten der Konjugate wurden bei einer festgesetzten Konjugatkonzentration dargestellt. (Bedingungen: [Konjugate; PEG] = 2.03 mM, Raumtemperatur, pH = 7, Verdünnung 1:20).<sup>[153]</sup>

Insgesamt wurde eine Abhängigkeit der Wirkstoffkapazität von der Peptidsequenz der Konjugate deutlich. Möglicherweise störte das Vorkommen von Gly oder Lys wie in  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG eine effektive Wirkstoffbindung, während das hydrophobe Phe-Leu-Segment, flankiert von zwei Gln, wie in  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG, eine hohe Kapazität ermöglichte.<sup>[153]</sup> Durch das Konjugat

Pep<sub>2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG konnte insgesamt das beste Wirkstoff:Transporter-Verhältnis aller Rhodanin-Komplexe erhalten werden.

#### Ermittlung der hydrodynamischen Radien der bb15-Komplexe

Die bb15-affinen Peptid-PEG-Konjugate lagen vor der Wirkstoffbeladung wie die anderen Rhodanin- und B4A1-zugehörigen Konjugate molekular gelöst vor. Im Gegensatz dazu bildeten sich für alle bb15-Konjugat-Komplexe kolloide Aggregate mit  $R_h = 63$  nm für bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG und  $R_h = 49$  nm für bb15/Pep<sub>2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG aus.

Insgesamt zeigte das System bb15/Pep<sub>2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG auffälligerweise sowohl die höchste Wirkstoffbeladung von allen Rhodanin-Konjugat-Komplexen als auch den kleinsten  $R_h$  auf. Möglicherweise lag in diesem Komplex die stärkste Bindung zwischen Wirkstoff und Konjugat vor. Interessanterweise ließen sich für jedes der bb14-, bb17- und bb15-Systeme unterschiedliche Wirkstoffkapazitäten und Größenverhältnisse nachweisen. Dies war umso bedeutender, da sich die Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Strukturen nur marginal unterscheiden und dennoch unterschiedliche Verhaltensweisen aufzeigten.

Der Aufbau der bb15-Konjugat-Komplexe könnte mit der für die bb14-Komplexe vorgeschlagenen Struktur übereinstimmen (**vgl. Kapitel 3.2.2., Abb. 39**). Dafür würde die weitaus geringere Größe der Aggregate im Vergleich zu den B4A1-Systemen sprechen (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 2, vgl. Kapitel 3.2.2., Abschnitt 2, Kapitel 3.2.3. Abschnitt 2 und 3.2.4. Abschnitt 2**). Unterschiede in den Systemen waren vor allem in der Polarität der Wirkstoffe als auch in der Hydro- bzw. Lipophilie der Peptidsequenzen zu suchen. B4A1 ist eine deutlich hydrophilere Substanz als die Rhodanin-Derivate bb14, bb17 und bb15. Dementsprechend waren auch die zugehörigen Peptidsequenzen mit hoher Kapazität zu B4A1 durch das häufige Auftreten der geladenen kationischen Aminosäuren Lys, Arg und His stark hydrophile Sequenzen, in denen der aromatische Anteil an der Aminosäure Phe weniger stark ins Gewicht fiel. Im Gegensatz dazu waren die Peptidsequenzen, die für die Rhodanine identifiziert wurden, stark hydrophobe Sequenzen, die keine oder nur vereinzelt geladene Aminosäuren beinhalteten. So ließ sich vermuten, dass die Rhodanin-Komplexe eine geordnete Struktur aufwiesen, in denen die hydrophoben Wirkstoffmoleküle und die Peptidsequenzen ins Innere des Komplexes ragten, während der polymere, wasserlösliche Teil des Konjugats, die PEG-Moleküle, die Aggregate nach außen hin abschirmten. Im B4A1-Komplex hingegen wäre es möglich, dass eine weniger dichte, offenere Komplexstruktur vorlag (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 2 und Abb. 28**).

#### Kreuzinkubationen

In den vorangehenden Abschnitten konnten in verschiedenen Screeningprozeduren Peptid-PEG-Konjugate für die Solubilisierung der Wirkstoffe B4A1, bb14, bb17 und bb15 entworfen, synthetisiert und beladen werden (**vgl. Kapitel 3.1. und 3.2.**). Die Auswahlkriterien der Screenings führten zum Erhalt von Konjugaten mit hoher Wirkstoffkapazität. Inwiefern die Formulierungsadditive auch Wirkstoff-Spezifität aufwiesen, sollte im Folgenden exemplarisch untersucht werden.

Für diese Studien wurden die drei strukturell ähnlichen Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15 ausgewählt. Falls sich für die Rhodanine wirkstoffspezifische Unterschiede im Solubilisierungsverhalten zeigten, sollten sich zwischen strukturell stärker abweichenden Wirkstoffen ebenfalls Spezifitäten ergeben. Für die Kreuzinkubation sollten die Solubilisierungen der Substanzen durch je ein Konjugat erfolgen, das aus den Screeningprozeduren der jeweils anderen Wirkstoffe hervorging. Es wurden die jeweils aussagekräftigsten Kombinationen an Konjugaten und Wirkstoffen gewählt. Dementsprechend wurden Konjugate eingesetzt, für die eine möglichst hohe Wirkstoffkapazität anzunehmen war. Sollten diese Kreuzinkubationen geringere Wirkstoffkapazitäten im Vergleich zur Solubilisierung durch das ursprüngliche Konjugat mit sich bringen, so wäre ein erster Hinweis auf die Wirkstoffspezifität der Peptid-PEG-Konjugate erbracht und würde sich vermutlich auch für weitere Kreuzinkubationen ergeben.

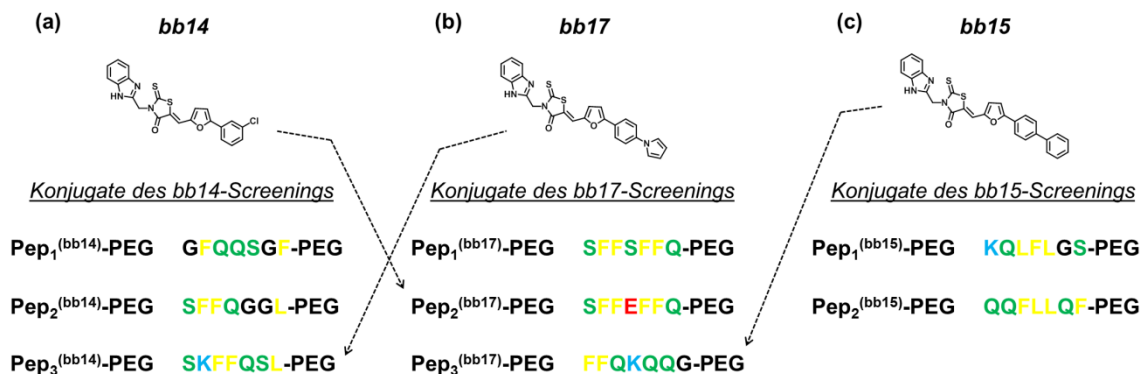
Auf Grundlage dieser Überlegungen sollte bb14 durch das für bb17 entwickelte Konjugat  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG solubilisiert werden. Da bb14 offenbar vor allem eine gute Bindung zu Peptidsequenzen mit lediglich zwei aromatischen Aminosäuren und einem hohen Anteil an polaren Aminosäuren einging (**Abb. 43a**), war es von Bedeutung zu untersuchen, inwiefern ein Konjugat des bb17-Screenings mit einem weitaus höherem Anteil an aromatischen Aminosäuren bb14 solubilisierte. Das Konjugat  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG wurde außerdem für die Solubilisierung von bb14 gewählt, da es als einziges aller Rhodanin-Konjugate die saure Aminosäure Glu enthielt. Glu hatte offenbar eine Bedeutung für die Ausbildung von bb17-Konjugat-Komplexen. Inwiefern die Aminosäure auch einen Einfluss auf die bb14-Solubilisierung hätte, war von großem Interesse, da Wechselwirkungen zwischen dem Chlorsubstituent von bb14 und der Säuregruppe von Glu denkbar waren. Somit könnte das Konjugat  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG von allen Rhodanin-Konjugaten am besten zu einer effektiven Solubilisierung von bb14 führen.

bb17 sollte durch das aus dem bb14-Screening hervorgegangene Konjugat  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG solubilisiert werden. Dieses Konjugat wurde ausgewählt, da es zum einen die Grundstruktur der bb14-Konjugate widerspiegelte – ein aromatischer Zweierblock und viele polare Aminosäuren. Zum anderen beinhaltete es zudem ein Lysin und war somit dem aus dem bb17-Screening hervorgegangenen Konjugat  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG sehr ähnlich, das ebenfalls eine Phe-Dyade, drei polare Aminosäuren und ein Lysin enthielt (**Abb. 43b**). Sollten sich diese beiden für verschiedene Wirkstoffe entworfenen Konjugate in der Solubilisierung von bb17 unterscheiden, so wäre das ein solider Hinweis auf die Wirkstoff-Spezifität der Peptid-PEG-Konjugate. Rational betrachtet ähneln sich beide Konjugate stark und sollten ungefähr gleich gut für die Solubilisierung von bb17 geeignet sein.

bb15 sollte anschließend durch das für bb17-entworfene Konjugat  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG solubilisiert werden. Das bb15-Screening ergab vor allem Sequenzen mit großem hydrophobem Block in der Mitte der Peptidsequenz und eine Anhäufung polarer Aminosäuren (**Abb. 43c**). Um Wirkstoffspezifität nachweisen zu können, wurde eine Peptidsequenz gewählt, die einer Sequenz aus dem bb15-Screening am nächsten kam. So ergaben sich Parallelen zwischen den Konjugaten  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG und  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG. Beide enthielten dreimal die Aminosäure Gln und einen hydrophoben Aminosäureblock. Zudem verfügte  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG auch über ein Lysin, wie es in  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG vorkam und für die Wirkstoffsolubilisierung von Bedeutung zu sein schien. Somit konnte  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG als Mischung der Eigenschaften von  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG



und  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG angesehen werden, was eine effektive Solubilisierung von bb15 wahrscheinlich machte.



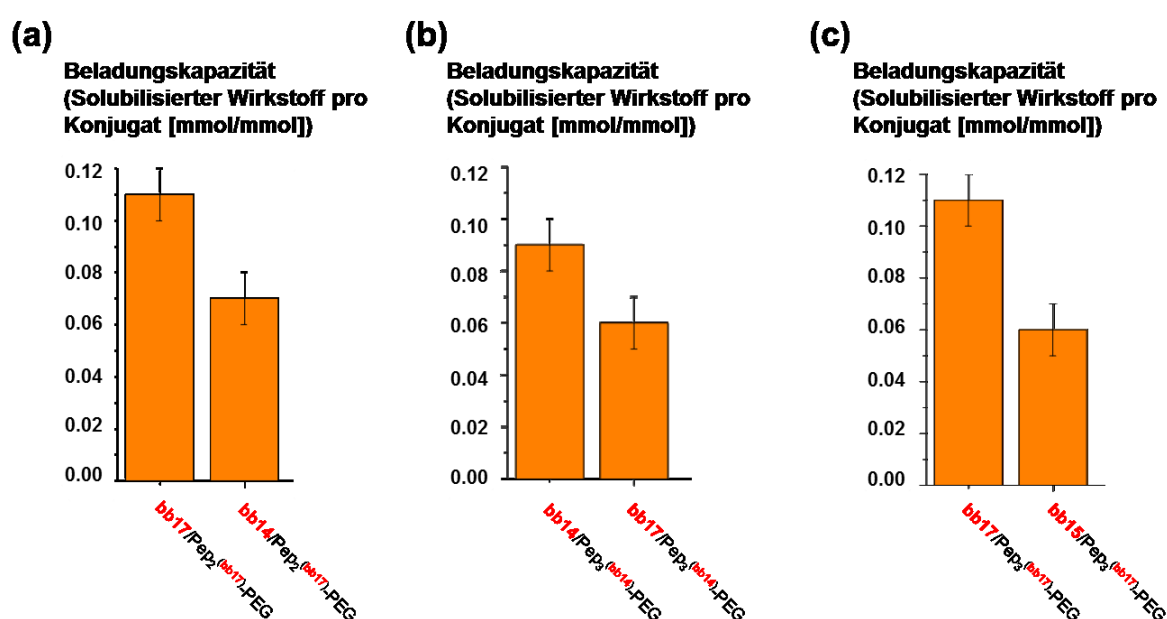
**Abb. 43.** Übersicht der für die Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15 synthetisierten Konjugate. Die Peptidsequenzen wurden in den jeweiligen Screenings erhalten und ergaben Peptid-PEG-Konjugate mit hoher Wirkstoffkapazität. Inwiefern die Peptidsequenzen zudem Wirkstoffspezifität aufwiesen, sollte durch exemplarische Kreuzinkubationen ermittelt werden. Die Auswahl der Konjugate für die Wirkstoffsolubilisierungen wurde durch Pfeile dargestellt. So sollte bb14 durch  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG, bb17 durch  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG und bb15 durch  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG solubilisiert werden. Farbcode: Aromatisch/hydrophob: gelb; anionisch/polar: blau; kationisch/polar: rot; polar: grün.

Die Beladung des für den Wirkstoff bb17 spezifischen Konjugats  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG mit bb14 führte tatsächlich zu einer Abnahme der Wirkstoffkapazität um 36% (molares Verhältnis = 0.07 bb14/Konjugat) (**Abb. 44a**). Offenbar war die mit vier Phe stark aromatische Struktur von  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$  für die Solubilisierung von bb17 besser als für bb14 geeignet, obwohl auch bei bb14  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten von Wirkstoff und Konjugat denkbar waren. Da sich die strukturellen Unterschiede zwischen bb14 und bb17 auf die Biaryleinheiten beschränkten, müssten die unterschiedlichen Solubilisierungsergebnisse wahrscheinlich mit diesen Einheiten zusammenhängen. Der Chlorbenzol-Substituent in bb14 war möglicherweise wie in **Kapitel 3.1.6., Abschnitt 2** vermutet durch den elektronenziehenden Effekt des Chlors elektronenärmer als der Biaryl-Substituent von bb17, da weniger aromatische Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Peptid aufzutreten schienen. Mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Chlorsubstituent von bb14 und dem Konjugat schienen interessanterweise ebenfalls keine bedeutende Rolle in der Wirkstoffsolubilisierung zu spielen.

Auch beim Wirkstoff bb17 ergab sich durch Solubilisierung mit dem für bb14 entworfenen Konjugat eine weniger effektive Wirkstoffsolubilisierung im Vergleich zum herkömmlichen Komplex bb14/ $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG. Die Wirkstoffkapazität für das System bb17/ $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG erfuhr eine Kapazitätsabnahme um 33% (molares Verhältnis = 0.06 bb17/Konjugat) (**Abb. 44b**). Diese unterschiedlichen Ergebnisse waren überraschend, da die Grundstruktur des bb14-Screening-Konjugats  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG dem Konjugat  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG, das für bb17 entworfen wurde, stark ähnelte. Da sich trotzdem unterschiedliche Solubilisierungsverhalten

ergaben, konnte die exemplarisch bewiesene Wirkstoff-Spezifität der Konjugate unterstrichen werden.

Die Beladung des für bb17 entwickelten Konjugats  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG mit dem Wirkstoff bb15 führte ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der Wirkstoffkapazität um 46% (molares Verhältnis = 0.06 bb15/Konjugat) im Vergleich zum bb17-Komplex bb17/ $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG (**Abb. 44c**). Obwohl das bb17-Konjugat  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG strukturelle Parallelen zu den bb15-Screening-Konjugaten  $\text{Pep}_1^{(\text{bb15})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{bb15})}$ -PEG zeigte, konnte es bb15 offenbar nicht gleich effektiv solubilisieren. Möglicherweise war der für Konjugate mit hoher bb15-Kapazität typische hydrophobe Block in der Mitte der Peptidsequenz tatsächlich das zentrale Element der Wirkstoffsolubilisierung. Eine derartige Form der bb15-Solubilisierung durch das Konjugat  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG mit nur einem aromatischen Zweierblock wäre vermutlich nicht möglich.



**Abb. 44.** Übersicht der Solubilisierung der potentiellen Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15 durch die Konjugate  $\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG,  $\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG und  $\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG, die in den Screeningprozeduren der jeweils anderen Wirkstoffe identifiziert wurden. (Bedingungen:  $[\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}\text{-PEG}] = 2.21 \text{ mM}$ ,  $[\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}\text{-PEG}] = 2.07 \text{ mM}$ ,  $[\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}\text{-PEG}] = 2.03 \text{ mM}$ , Raumtemperatur, pH = 7).

Somit konnte exemplarisch bewiesen werden, dass obwohl die drei Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15 nur geringfügige strukturelle Unterschiede aufwiesen, mithilfe der beschriebenen Screeningprozeduren maßgeschneiderte und selektive Peptid-Polymer-Konjugate zur Wirkstoffsolubilisierung entworfen werden konnten. Da diese Unterschiede bereits bei diesen eng verwandten Wirkstoffen auftraten, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich zwischen Wirkstoffen, die sich strukturell stärker unterscheiden, ebenfalls spezifische Abweichungen im Solubilisierungsverhalten zeigen würden.

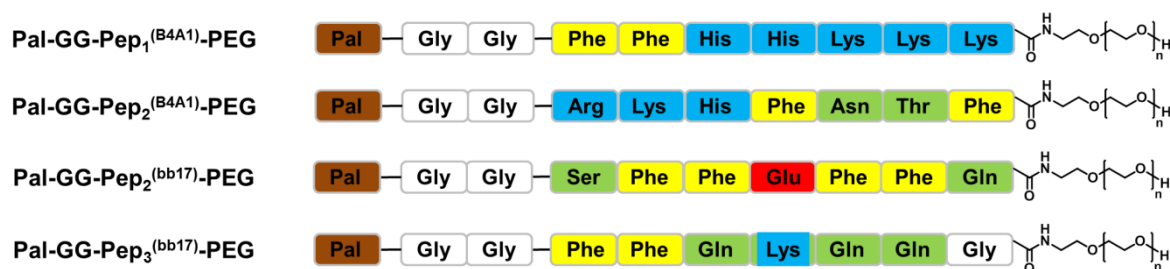
### 3.3. Erweiterung des Peptid-Polymer-Konjugat-Konzepts

Das der Arbeit zugrundeliegende Konzept der Wirkstoffsolubilisierung durch maßgeschneiderte Peptid-PEG-Konjugate konnte in zahlreichen Versuchen bestätigt werden. So zeigten Solubilisierungsexperimente die gute Löslichkeitsvermittlung der Konjugate (**vgl. Kapitel 3.2.**). Auch die Spezifität der Wirkstoff-Konjugat-Bindungen konnte mithilfe von Alanin- und Serinscans exemplarisch für zwei B4A1-Komplexe nachgewiesen werden (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 5**). Beispielhaft erfolgte zusätzlich der Nachweis spezifischer Bindungen in den Rhodanin-Komplexen mittels Durchführung von Kreuzinkubationen (**vgl. Kapitel 3.2.4., Abschnitt 3**).

Eine interessante Anforderung an die vorgestellten Peptid-Polymer-Konjugate zur Wirkstoffsolubilisierung war die Erhöhung ihrer Wirkstoffkapazität. Bei herkömmlichen amphiphilen Solubilisatoren wie Pluronic<sup>®</sup> könnte zwar durch Erhöhung des hydrophoben Blockanteils eine verbesserte Wirkstoffaufnahme erreicht werden, aber die Feineinstellung der gezielten Wirkstoffabgabe wäre aufgrund fehlender Spezifität der Wirkstoffanbindung nicht möglich.<sup>[148, 163]</sup> Auch die Verringerung der Aggregatgrößen zur Steigerung der Komplexstabilität wäre von Vorteil.

Das Peptidsegment der Konjugate stellte das sowohl kostenintensivste als auch das synthetisch betrachtet aufwändigste Segment für die Solubilisierung unlöslicher Wirkstoffe durch Peptid-PEG-Konjugate dar. Durch Änderung der Konjugat-Architektur in eine Triblock-Struktur aus PEG, Peptid und Palmitinsäure (Pal) könnten diese Nachteile minimiert werden. Die unlöslichen Wirkstoffe, die durch Konjugate solubilisiert werden sollten, sind hydrophober Natur. Daher könnte die Wirkstoffkapazität der Konjugate durch Einführen eines weiteren hydrophoben Segments – Palmitinsäure – gesteigert werden. Während der PEG-Block die Abschirmung des Komplexes gegen das Lösungsmittel Wasser ermöglichen würde, würden Peptidsequenz und Palmitinsäure zur Bindung der Wirkstoffe zur Verfügung stehen. Auf diese Weise würde der prozentuale peptidische Anteil im Konjugat verringert und die Kapazität vermutlich gesteigert werden.

Mit Palmitinsäure modifizierte Konjugate wurden exemplarisch für die Systeme B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und bb17/Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG synthetisiert. Die Einführung des Palmitinsäuresegments erfolgte durch *N*-terminale Amidierung der um einen Gly-Gly-Abstandshalter verlängerten etablierten Konjugate mit Palmitinsäure.<sup>[148]</sup> Mittels forcierter Beladungsprozedur wurden die Konjugate zu den jeweiligen Wirkstoffen gegeben (**vgl. Exp. Teil**). Es wurden die Wirkstoff-Konjugat-Systeme B4A1/Pal-GG-Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und bb17/Pal-GG-Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG erhalten (**Abb. 45**). Die zugehörigen maximalen Beladungskapazitäten wurden durch UV/Vis-Spektroskopie bei 384 nm (B4A1), bzw. 473 nm (bb17) ermittelt.

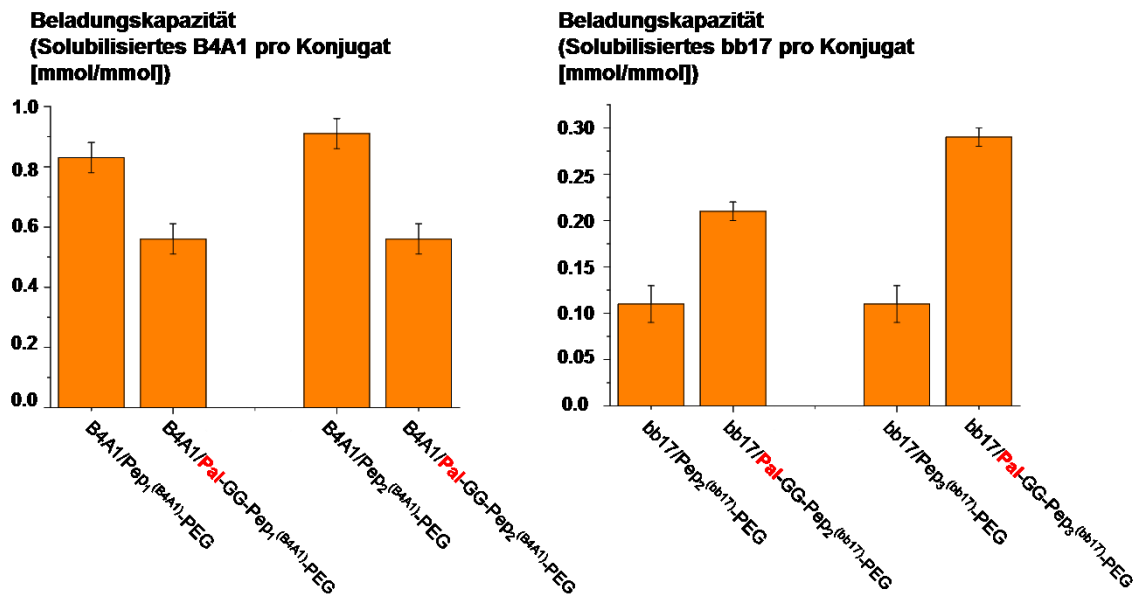


**Abb. 45.** Durch Palmitinsäure modifizierte Peptide-Polymer-Konjugate Pal-GG-Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pal-GG-Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG. Ziel der Modifizierung war die Erhöhung der Wirkstoffkapazität der herkömmlich verwendeten Konjugate und der Stabilität der resultierenden Wirkstoff-Konjugat-Komplexe.

Die Beladung der mit Palmitinsäure modifizierten Konjugate mit den zugehörigen Wirkstoffen B4A1, bzw. bb17 führte im Fall der B4A1-Komplexe zu einer Abnahme des Beladungsgrads, während im Fall der Rhodanin-Komplexe eine Steigerung der Solubilisatorkapazität ermittelt wurde. Dabei nahm die B4A1-Konzentration bei Pal-GG-Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG um 33% (molares Verhältnis = 0.56 B4A1/Konjugat) und bei Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG um 39% (molares Verhältnis = 0.56 B4A1/Konjugat) im Vergleich zum nichtmodifizierten Konjugat ab. Die entsprechenden Angaben in Gew.-% betragen 5.3 Gew.-% an B4A1 im Komplex B4A1/Pal-GG-Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und 5.4 Gew.-% an B4A1 im Komplex B4A1/Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG.

Die Begründung für die Abnahme der Wirkstoffkapazität könnte sein, dass die Struktur der herkömmlichen B4A1-Komplexe durch den im Vergleich zu den Rhodaninen bb14, bb17 und bb15 hydrophileren Wirkstoff und die zugehörigen Peptidsequenzen wie vorgeschlagen (vgl. Kapitel 3.2.1., Abb. 28) relativ offen und dynamisch war. Ein Einbau von Palmitinsäure könnte diese für die Wirkstoffaufnahme optimale Anordnung der Konjugat- und Wirkstoffmoleküle durch eine erhöhte Hydrophobie des Konjugats stören, sodass sich weniger effektive Bindungen ausbilden könnten.

Im Fall des hydrophoben Wirkstoffs bb17 trat bei den modifizierten Konjugaten wie erwartet eine Erhöhung der Solubilisatorkapazität bei Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG um 91% (molares Verhältnis = 0.21 bb17/Konjugat) und bei Pal-GG-Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG um 164% (molares Verhältnis = 0.29 bb17/Konjugat) im Vergleich zu den nichtmodifizierten Konjugaten ein. In Gew.-% entspricht dies bei den modifizierten Komplexen 2.4 Gew.-% an bb17 im Komplex bb17/Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und 3.3 Gew.-% an bb17 im Komplex bb17/Pal-GG-Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG. Diese Verbesserung der Wirkstoffaufnahme könnte aufgrund der Vergrößerung des hydrophoben Anteils im Konjugat durch Palmitinsäure entstehen (Abb. 46).<sup>[148]</sup>



**Abb. 46.** Übersicht über die Solubilisierung von B4A1 und bb17 durch die mit Palmitinsäure modifizierten Konjugate Pal-GG-Pep<sub>1-2</sub>(B4A1)-PEG und Pal-GG-Pep<sub>2-3</sub>(bb17)-PEG. Die Messung der maximalen Wirkstoffkapazitäten erfolgte bei festen Konjugatkonzentrationen. (Bedingungen: [Pal-GG-Pep<sub>1-2</sub>(B4A1)-PEG] = 2.44 mM, [Pal-GG-Pep<sub>2-3</sub>(bb17)-PEG] = 2.07 mM, Raumtemperatur, pH = 7).

Um eine genauere Vorstellung der Bildung der Wirkstoff-Transporter-Komplexe der Pal-modifizierten Konjugate im Vergleich zu den herkömmlichen Konjugaten zu erhalten, wurden DLS-Experimente durchgeführt (**Tab. 5**). Für die Pal-modifizierten Konjugate konnten vor der Wirkstoffbeladung keine  $R_h$  bestimmt werden, während es bei den wirkstoffbeladenen Pal-Konjugaten zur Ausbildung kolloider Aggregate kam. Insgesamt wiesen die Pal-modifizierten Komplexe generell kleinere  $R_h$  als die unmodifizierten Komplexe auf. Mit einem  $R_h = 96$  nm für das System B4A1/Pal-GG-Pep<sub>1</sub>(B4A1)-PEG konnte eine Verringerung des Radius um 9% im Vergleich zum unmodifizierten System B4A1/Pep<sub>1</sub>(B4A1)-PEG ( $R_h = 105$  nm) erreicht werden. Für das System B4A1/Pal-GG-Pep<sub>2</sub>(B4A1)-PEG ( $R_h = 82$  nm) ergab sich eine noch stärkere Abnahme des Radius um 53% im Vergleich zu B4A1/Pep<sub>2</sub>(B4A1)-PEG ( $R_h = 175$  nm). Auch das System bb17/Pal-GG-Pep<sub>2</sub>(bb17)-PEG zeigte mit einem  $R_h$  von 47 nm eine Abnahme des  $R_h$  um 34% verglichen mit bb17/Pep<sub>2</sub>(bb17)-PEG ( $R_h = 71$  nm). Der Einbau von Palmitinsäure in die Konjugate schien demnach die Aggregation bei der Wirkstoffbeladung der Konjugate zu stabilisieren und die Ausbildung kompakterer Aggregate zu begünstigen.<sup>[148]</sup>

Das System bb17/Pal-GG-Pep<sub>3</sub>(bb17)-PEG zeigte eine zweigeteilte Größenverteilung. Es traten Komplexe mit einem  $R_h = 36$  nm und somit einer Größenabnahme um 35% verglichen mit bb17/Pep<sub>3</sub>(bb17)-PEG mit einem  $R_h = 55$  nm auf. Dies entsprach den Erwartungen. Andererseits ließen sich auch Aggregate mit einem  $R_h = 194$  nm nachweisen. Vermutlich erfolgte die Bildung dieser größeren Aggregate durch die enorme Erhöhung des Solubilisatorkapazität in diesem System. Die stärker hydrophoben Aggregate im Vergleich zum Normalsystem waren möglicherweise in wässriger Lösung weniger stabil und formierten

sich deshalb zu größeren Aggregaten, um das hydrophobe Innere des Komplexes besser gegen die wässrige Umgebung abschirmen zu können (Tab. 5).

**Tab. 5.** Übersicht der ermittelten  $R_h$ -Werte der durch Palmitinsäure modifizierten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe. Untersuchungen erfolgten von den Komplexen B4A1/Pal-GG-Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, Pal-GG-Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und wurden im Vergleich zu den Komplexen B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und bb17/Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG angegeben.

Substanz	$R_h$ [nm]
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	105
B4A1/Pal-GG-Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	96
B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	175
B4A1/Pal-GG-Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	82
bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	71
bb17/Pal-GG-Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	47
bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	55
bb17/Pal-GG-Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	36*

\* Für dieses bb17-Konjugat-System wurde zudem ein  $R_h$  von 194 nm gemessen.

Durch die Einführung eines hydrophoben Palmitinsäuresegments in die Konjugate Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG konnten die Eigenschaften der resultierenden Komplexe verändert werden. Während sich für die Wirkstoffkapazität der Pal-B4A1-Konjugate eine Abnahme um ca. ein Drittel im Vergleich zu den ursprünglichen Systemen ergab, konnte die Kapazität der Rhodanin-Konjugate um ca. 160% gesteigert werden. Dies stellte eine interessante und kostengünstige Modifizierung des ursprünglichen Konjugats dar. Für alle Pal-modifizierten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe konnten deutlich kleinere, kompaktere Konstrukte im Vergleich zu den Ausgangskomplexen dargestellt werden. Für Folgeanwendungen in Biotests könnten sich hier klare Vorteile ergeben. Partikel mit einem  $R_h$  von 5-50 nm eignen sich üblicherweise am besten in Hinblick auf die Penetration in kleine Gewebekapillaren, Verteilungen im Zielgewebe und gute Blutzirkulationszeiten.<sup>[4]</sup>

### 3.4. Anwendung der Wirkstoff-Transporter-Komplexe in *in vitro* Biotests der Tau-Protein-Aggregation

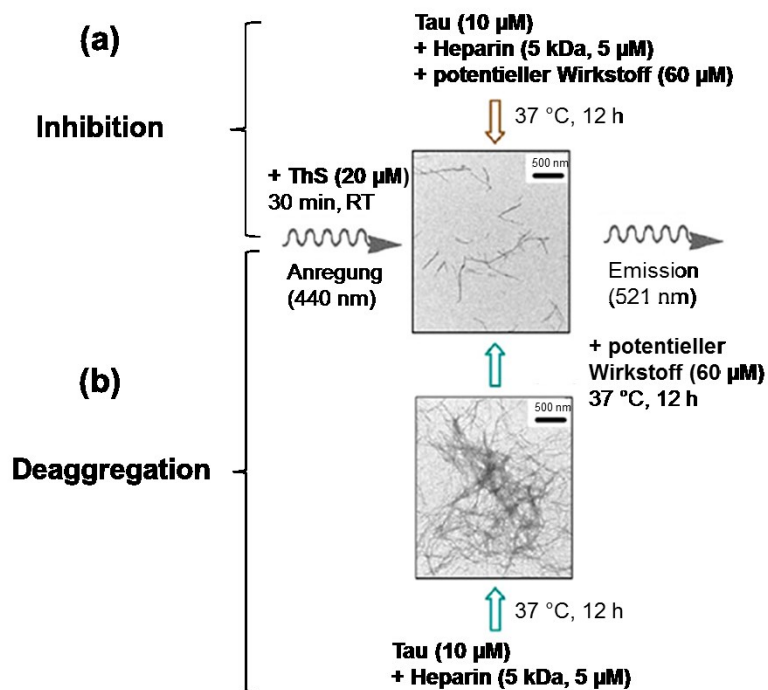
Abgesehen von der guten Löslichkeitsvermittlung der maßgeschneiderten Konjugate galt es, eine geringe Toxizität des Wirkstoff-Solubilisator-Systems und die Verfügbarkeit des Wirkstoffs in den angestrebten Bioprozessen der Anwendung zu gewährleisten. Für B4A1, bb17 und bb15 wurden die vielversprechendsten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in umfangreichen Biotests auf ihre Wirkung bezüglich der Inhibition und der Deaggregation von Tau-Protein-Aggregaten, die zu AD beitragen, getestet. Im Folgenden sollen zunächst die

etablierten zellfreien und N2a-Zelltests näher erläutert werden. Diese Tests wurden in der dargelegten Arbeit zur Bewertung der Aktivitäten der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe genutzt. Alle vorliegenden Biotests wurden in der Arbeitsgruppe von E. Mandelkow von M. Pickhardt (DZNE, Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, GER) durchgeführt.<sup>[164]</sup>

#### Etablierte zellfreie Biotests der Tau-Protein-Aggregation

Zur Identifizierung potentieller Inhibitoren der Tau-Protein-Aggregation wurde ein Wirkstoff-Screening mit dem Tau-Konstrukt K19 (vgl. **Kapitel 2.1.2.**, **Abb. 3**) durchgeführt (**Abb. 47**).<sup>[35]</sup> Die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse konnte durch weitere Biotests und die Verwendung anderer Tau-Konstrukte und -Isoforme erfolgen.<sup>[35]</sup> Das Konstrukt K19 wurde für das breite Wirkstoff-Screening gewählt, da es Fasern ausbildet, die den PHFs aus Gehirnen von AD Patienten sehr ähnlich sind.<sup>[30a]</sup> Zudem erfolgte die Protein-Aggregation verlässlich über Nacht, sodass eine Automatisierung des Wirkstoffscreenings möglich war.<sup>[26]</sup> K19 stellt ein im Vergleich zu anderen Tau-Konstrukten kurzes Gebilde dar – ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Isoforms, da der synthetische Aufwand somit begrenzt wurde.<sup>[33]</sup> Unter Verwendung des Farbstoffs Thioflavin S (ThS) konnte die Wirksamkeit der potentiellen Tau-Aggregationsinhibitoren in einem Fluoreszenz-Test bewertet werden.<sup>[26]</sup> In Abhängigkeit der Intensität der K19-Aggregation, d.h. in der Anwesenheit von PHFs, stieg die Fluoreszenz-Emission von ThS bei 521 nm bei einer Anregung von 440 nm merklich.<sup>[26]</sup>

Im Primärscreening wurde das Tau-Protein unter aggregationsinduzierenden Bedingungen (10  $\mu$ M K19 in der Anwesenheit von 5  $\mu$ M Heparin über Nacht bei 37°C) im Beisein der potentiellen Wirkstoffe (60  $\mu$ M) über Nacht inkubiert (**Abb. 47a**). Die Quantifizierung des aggregierten Tau-Proteins erfolgte durch die Zugabe von ThS und Messung der auftretenden Fluoreszenz. Um die Fähigkeit der stark aktiven Substanzen des ersten Screenings zur Deaggregation von Tau-Aggregaten im Sekundärscreening zu untersuchen, wurden bereits gebildete PHFs von K19 (10  $\mu$ M) über Nacht mit den potentiellen Wirkstoffen (60  $\mu$ M) bei 37°C inkubiert und anschließend die ThS-Fluoreszenz der verbliebenen Fibrillen gemessen (**Abb. 47b**).<sup>[36]</sup>



**Abb. 47.** ThS-Fluoreszenz-Assay für (a) potentielle Inhibitoren der Aggregation des Tau-Proteins zu PHFs und (b) potentielle Wirkstoffe für die Deaggregation bereits gebildeter PHFs. Adaptiert mit Erlaubnis von <sup>[35]</sup> und B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, *Angewandte Chemie International Edition*<sup>[1a]</sup>, herausgegeben von John Wiley and Sons. Copyright 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Von einer Vielzahl der Verbindungen, die in beiden Screeningverfahren hohe Aktivitäten zeigten, wurden die  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{DC}_{50}$ -Werte ermittelt, d.h. die *in vitro* Konzentrationen der potentiellen Wirkstoffe. Mithilfe dieser Wirkstoffkonzentrationen konnte die Aggregation des Tau-Proteins um die Hälfte inhibiert, bzw. die Deaggregation der PHFs um die Hälfte induziert werden.<sup>[26]</sup>

### Etablierte N2a-Zelltests der Tau-Protein-Aggregation

Die in den zellfreien Biotests aktivsten Substanzen wurden anschließend einer Untersuchung in einem neuronalen Zellmodell unterzogen. Hierfür wurden Zelllinien des Typs N2a/K18 $\Delta$ K280 verwendet.<sup>[66]</sup> Diese enthielten die Repeat-Domäne mit vier Wiederholungseinheiten von K18 und die Deletionsmutation  $\Delta$ K280, die sich durch ihre hohe Tendenz zu spontaner Aggregation für das Zellmodell eignete.<sup>[66]</sup> Durch die Zugabe von Doxycyclin (Dox) konnte die Expression des Proteins im Inhibitionsassay induziert werden. Sowohl die Kontrollprobe als auch die Proben mit zugesetzten Wirkstoffen wurden für fünf Tage inkubiert. Nach Aufarbeitung der Proben erfolgte die Inkubation mit ThS. Abschließend wurden die Proben mit dem Kaninchenantikörper K9JA und dem mit Cy5 markierten, sekundären anti-Kaninchenantikörper inkubiert.<sup>[70]</sup> Mithilfe der ThS-Färbung wurde die Quantifizierung der in den Zellen enthaltenen Tau-Aggregate möglich.<sup>[1a, 62, 70]</sup>



Um den Anteil an löslichen und unlöslichen Bestandteilen von Tau(aggregaten) in den Zellen nach Inkubation mit den potentiellen Wirkstoffen ermitteln zu können, wurden die Zellen durch Pelletierung gesammelt. In mehreren Arbeitsschritten wurden schließlich der Überstand (engl.: Supernatant, S) mit den löslichen - und das abzentrifugierte Pellet (engl.: Pellet, P) mit den unlöslichen Taubestandteilen voneinander getrennt und mittels Western Blot analysiert. Der Anteil der verschiedenen Tauspezies in den Überstands- und Pelletproben wurde durch Versetzung des Western Blots mit dem pan-Tau Antikörper K9JA und anschließender Analyse durch Densitometrie ermittelt.<sup>[66]</sup>

Rhodaninderivate, die im primären und sekundären Screening für potentielle anti-AD-Wirkstoffe sehr gute Aktivitäten gezeigt hatten, wurden auch im beschriebenen Zelltest auf ihre Wirksamkeit in Bezug auf die Tau-Aggregationsinhibition getestet. Die Verbindungen zeigten Aktivitäten ohne Zelltoxizität. Mit einer Inhibitionsrate von 70% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung zeigte bb14 eine sehr hohe Aktivität. Weniger aktive Wirkstoffe penetrierten die Zellmembran möglicherweise weniger.<sup>[1a]</sup>

Die Ergebnisse der Rhodanin- und N-Phenylamin-Derivate hinsichtlich der Tau-Proteinaggregation wurden jedoch unter Zusatz von 2% DMSO erhalten. Da DMSO im Verdacht steht, mögliche Proteinfunktionen zu modulieren, ist der Ersatz dieses Lösungsmittels in den Biotests erstrebenswert.<sup>[3]</sup> Dies sollte durch Solubilisierung der Wirkstoffe durch maßgeschneiderte Peptid-Polymer-Konjugate erreicht werden. Im Folgenden wurden die sehr gut wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexe zur Ermittlung ihrer Aktivitäten in den etablierten Biotests eingesetzt. Dabei wurde sowohl die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation als auch die Deaggregation bereits gebildeter Aggregate untersucht.

#### **3.4.1. Zellfreie in vitro Untersuchungen zum N-Phenylamin B4A1**

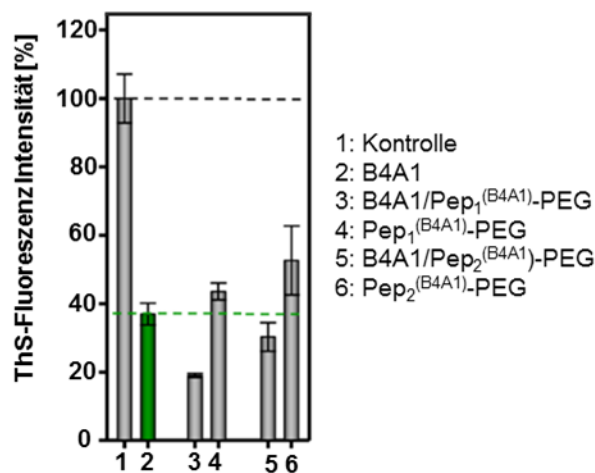
##### *Inhibition der Tau-Protein-Aggregation bei konstanter B4A1-Konzentration*

Die Untersuchungen zur Inhibition der Tau-Protein-Aggregation durch verschiedene B4A1-Systeme wurden in der Arbeitsgruppe von M. Pickhardt (Arbeitsgruppe E. Mandelkow, DZNE, Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, GER) durchgeführt. Zunächst wurden B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG in einem zellfreien Biotest der Tau-Protein-Aggregation des Konstrukts K19 getestet. Dabei wurde der Grad der Aggregationsinhibition der Komplexe bei einer konstanten B4A1-Konzentration von 30 µM ermittelt. Als Referenz dienten B4A1 unter Zugabe von 2% DMSO<sup>[162]</sup> zur Löslichkeitsvermittlung und die Konjugate ohne Wirkstoffbeladung (**Abb. 48**). Die Transporter wurden im gleichen stöchiometrischen Verhältnis eingesetzt, in dem sie im Komplex auftraten, um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Die Aggregation des Tau-Proteins wurde im Beisein der zu testenden Substanzen durch das Polyanion Heparin<sub>3000</sub> induziert.

Im Vergleich zu der mit Wirkstoff unbehandelten Kontrollprobe (**Abb. 48, Spalte 1**), deren Fluoreszenz-Intensität auf 100% der aggregierten Tau-Monomere normiert wurde, zeigte die mit B4A1 inkubierte Probe eine Verringerung der Tau-Protein-Aggregation um 63% (**Abb. 48, Spalte 2**). Die Inkubation mit den wirkstoffbeladenen Komplexen B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-

PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (**Abb. 48, Spalte 3 und 5**) erzielte eine noch höhere Inhibition der Aggregation um 81% und 68%. Demzufolge setzten die Komplexe B4A1 in Gegenwart des Tau-Proteins wie gewünscht frei, da anderenfalls eine Abnahme der Aggregation nicht möglich wäre. Es ist sogar denkbar, dass der Wirkstoff B4A1 durch die Bindung im Komplex besser vor chemischen Modifikationen wie Hydroxilierung oder Oxidation geschützt wurde. Somit könnte die inhibitorische Wirkung von B4A1 durch die spezifische Solubilisierung verbessert und eine deutlichere Abnahme der Tau-Protein-Aggregation erreicht werden.<sup>[164]</sup>

Auch die Peptid-Polymer-Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG zeigten eine inhibitorische Wirkung in Hinblick auf die Tau-Protein-Aggregation. Im Vergleich zur Kontrollprobe verringerten sie die Aggregation um 57% und 48%. Dies könnte daran liegen, dass entweder die im Konjugat enthaltenen Peptide direkt an das Tau-Protein binden und ähnlich wie bei der Wirkungsweise von B4A1 die Anlagerung weiterer Tau-Monomere verhindern. Zudem könnte das sterisch anspruchsvolle PEG-Segment diesen Effekt durch räumliche Abschirmung des Tau-Proteins weiter verstärken. Aber auch das direkte Eingreifen der Konjugate in den Verlauf des Biotests, der noch weitere Komponenten beinhaltet, muss in Betracht gezogen werden.



**Abb. 48.** Einsatz der B4A1-Systeme in Inhibitionsversuchen der Tau-Protein-Aggregation des Tau-Konstrukts K19. Die Wirksamkeit von B4A1 allein unter Zusatz von DMSO, der Komplexe B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und der Konjugate Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung (Spalte 1, normiert auf 100%) aufgetragen. (Bedingungen: [B4A1; B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG] = 30 µM, [Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG] = 54 µM, [Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG] = 48 µM, [K19] = 10 µM in 50 mM NH<sub>4</sub>Ac, [Heparin<sub>3000</sub>] = 2.5 µM, 37°C, pH = 6.8).<sup>[164]</sup>

Im Allgemeinen sollte der Wirkstoff möglichst nicht zu schwach gebunden werden, damit der Transport des Wirkstoffs z. B. über Zellmembranen ohne die frühzeitige Abgabe des Wirkstoffs erfolgte, da sonst sehr hohe Konzentrationen des Systems eingesetzt werden müssten. Aber auch eine zu starke Bindung wäre nicht wünschenswert, da der Solubilisator im Idealfall möglichst den kompletten aufgenommenen Wirkstoff am Zielort der Anwendung im Zytosol wieder abgeben sollte, um eine möglichst hohe Dosis zu erreichen. Zudem sollte die Trägersubstanz, in diesem Fall das Peptid-PEG-Konjugat, nicht mit dem Target

wechselwirken, nach erfolgter Wirkstoffabgabe gut vom Körper abgebaut werden und eine möglichst geringe Toxizität aufweisen.<sup>[164]</sup>

Insgesamt konnte eine inhibitorische Wirkung der B4A1-Konjugat-Komplexe auf die Tau-Protein-Aggregation nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigten auch die Referenzmessungen der Konjugate ohne Wirkstoffbeladung einen inhibitorischen Effekt. Inwiefern diese Wirkungsweisen von der Konzentration der eingesetzten Systeme abhingen, sollte im Folgenden untersucht werden.

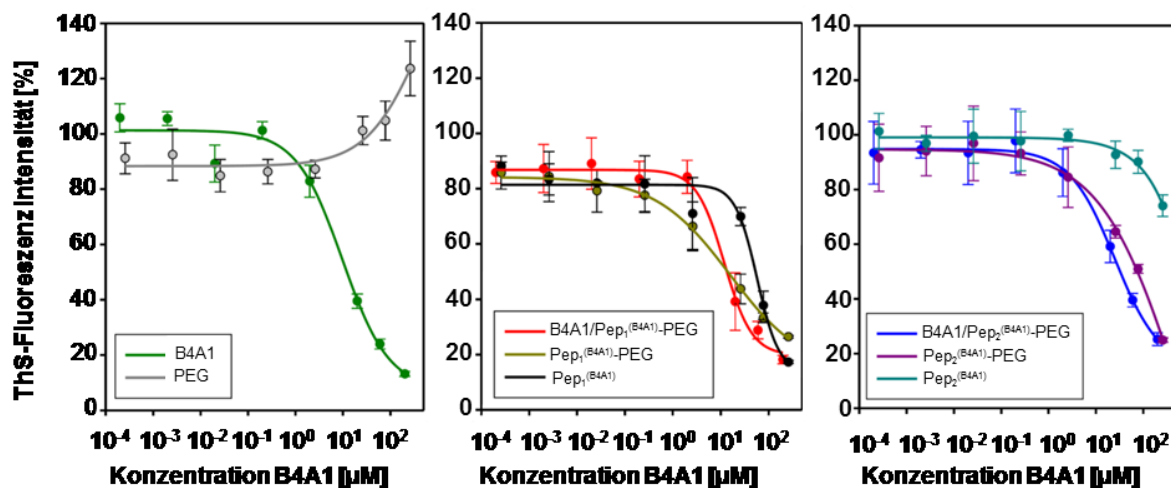
#### Dosis-Wirkungs-Experimente: Bestimmung von $IC_{50}$ -Werten

Um herauszufinden, wie sich die wirkstoffbeladenen Komplexe in Abhängigkeit von der Konzentration auf die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation auswirkten, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 200 pM bis 200  $\mu$ M für B4A1 und die Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG gewählt (für B4A1 allein unter Zusatz von 2% DMSO). Die Konzentration des Wirkstoffs wurde auf die Konzentration im Komplex bezogen. Alle Konzentrationen der Referenzmessungen, d.h. der Peptid-Polymer-Konjugate und Peptide der getesteten Komplexe sowie PEG, richteten sich nach dem stöchiometrischen Verhältnis, in dem die Komponenten in den Komplexen auftraten. Die Proben wurden in Gegenwart des aggregationsfördernden Polyanions Heparin<sub>3000</sub> mit dem Tau-Konstrukt K19 versetzt und die entstehenden Tau-Aggregate detektiert (**Abb. 49**). Zur Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte der Systeme wurden aus den Dosis-Wirkungs-Diagrammen die Konzentrationen abgelesen, durch die das Maß der Tau-Protein-Aggregation um die Hälfte inhibiert werden konnte. Ein guter  $IC_{50}$ -Wert zeichnete sich dementsprechend durch einen möglichst geringen Konzentrationswert des eingesetzten Wirkstoff(systems) aus.

Verglichen mit der Kontrollmessung von B4A1 unter Zusatz von DMSO, die einen  $IC_{50}$ -Wert von 12.1  $\mu$ M aufwies, zeigte PEG keinerlei inhibitorische Wirkung auf die Tau-Protein-Aggregation. Bezüglich der Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und der Kontrollmessungen der zugehörigen Konjugate und Peptide ließen sich bei allen Messungen inhibitorische Effekte beobachten. So ergab das System B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG einen  $IC_{50}$ -Wert von 13.5  $\mu$ M, ähnlich dem nicht beladenen Konjugat Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 14.1  $\mu$ M. Auch das Peptid Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> zeigte eine inhibitorische Wirkung mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 52.9  $\mu$ M. Dies machte deutlich, dass das Konjugat selbst Einfluss auf den Biotest hatte. Ein derartiges Verhalten der Trägersubstanzen zeigte sich bereits im Biotest der Tau-Protein-Aggregation bei festen Substanzkonzentrationen (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1**). Da das Peptid eine geringere inhibitorische Wirkung als das Konjugat mit sich brachte, lag die Vermutung nahe, dass das Peptid selbst an eine Komponente des Versuchs, z. B. Tau oder Heparin band. Dadurch könnte es die weitere Aggregation des Proteins verhindern oder einen Teil des im Biotest verwendeten Heparins binden, sodass dieses nicht mehr in der Lage war, eine Aggregation des Tau-Proteins wie im Kontrollexperiment hervorzurufen. Der Effekt wurde offensichtlich durch die PEGylierung des Peptids verstärkt, sodass die beeinträchtigte Komponente des Biotests durch das Konjugat effektiver abgeschirmt wurde als durch das Peptid allein. Auch unterschiedliche Löslichkeiten der gebildeten Peptid-, bzw. Konjugat-Addukte könnten eine Rolle spielen. So wäre ein

Peptidaddukt vermutlich schlechter wasserlöslich als ein Peptid-PEG-Addukt, das die hoch wasserlöslichen Ethylenoxid-Einheiten beinhaltet. Die Wahrscheinlichkeit der Adduktbildung wäre vermutlich umso größer, je besser die Wasserlöslichkeit des Addukts ist, da es thermodynamisch stabiler in der wässrigen Umgebung wäre. Daher könnte das Peptid allein eine geringere Bindung der Biotest-Komponente und somit einen höheren  $IC_{50}$ -Wert mit sich bringen.

Ähnliche Inhibitionseffekte wurden im System  $B4A1/Pep_2^{(B4A1)}$ -PEG und den zugehörigen Referenzen  $Pep_2^{(B4A1)}$ -PEG und  $Pep_2^{(B4A1)}$  detektiert. Der wirkstoffbeladene Komplex  $B4A1/Pep_2^{(B4A1)}$ -PEG zeigte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $32.8 \mu M$  die höchste Inhibitionsrate, die jedoch deutlich geringer als im Komplex  $B4A1/Pep_1^{(B4A1)}$ -PEG ausfiel. Das Konjugat  $Pep_2^{(B4A1)}$ -PEG mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $75.2 \mu M$  zeigte wiederum einen deutlich höheren inhibitorischen Effekt als das Peptid  $Pep_2^{(B4A1)}$  allein mit  $IC_{50} > 200 \mu M$  (**Tab. 6**). Demzufolge hatte wahrscheinlich auch das Peptid  $Pep_2^{(B4A1)}$  eine bindende Wirkung auf eine Komponente des Experiments, die jedoch schwächer ausgeprägt zu sein schien als bei  $Pep_1^{(B4A1)}$ . Offenbar hatten die unterschiedlichen Peptidsequenzen der Konjugate durchaus Einfluss auf die Wirkstoffabgabe und das Eingreifen des Peptids, bzw. Konjugats in den Biotest.<sup>[164]</sup>



**Abb. 49.** Dosis-Wirkungs-Experiment der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation. Die Wirksamkeit der Komplexe  $B4A1/Pep_{1-2}^{(B4A1)}$ -PEG, der Konjugate  $Pep_{1-2}^{(B4A1)}$ -PEG, sowie der Peptide  $Pep_{1-2}^{(B4A1)}$  wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung dargestellt. (Bedingungen:  $[B4A1; B4A1/Pep_{1-2}^{(B4A1)}-PEG] = 200 \text{ pM}-200 \mu M$ ,  $[Pep_{1-2}^{(B4A1)}-PEG; Pep_{1-2}^{(B4A1)}; PEG] = 260 \text{ pM}-260 \mu M$ ,  $[K19] = 10 \mu M$  in  $50 \text{ mM } NH_4Ac$ ,  $[Heparin_{3000}] = 2.5 \mu M$ ,  $37^\circ C$ ,  $pH = 6.8$ ).<sup>[164]</sup>

**Tab. 6.** Übersicht der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte im Dosis-Wirkungs-Experiment der Tau-Protein-Aggregation für das Tau-Protein-Konstrukt K19.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Wert [μM]
B4A1	12.1
PEG	nicht messbar
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup>	52.9
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	14.1
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	13.5
Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup>	> 200
Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	75.2
B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	32.8

Insgesamt zeigten sowohl die Peptide, die Konjugate als auch die Wirkstoff-Konjugat-Komplexe inhibitorische Effekte in den vorliegenden Dosis-Wirkungs-Experimenten. Besonders stark traten diese Phänomene beim Konjugat Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und dem Komplex B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG auf und waren sogar vergleichbar mit der inhibitorischen Wirkung von B4A1 allein ohne Formulierungsadditiv. Etwas schwächer zeigte sich der Effekt beim Komplex B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, dem Peptid Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> und dem Konjugat Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnten noch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, inwiefern B4A1 aus den Wirkstoff-Konjugat-Komplexen freigesetzt werden und eine inhibitorische Wirkung entfalten konnte. Da auch die Trägersysteme in den Biotest einzugreifen schienen, musste zunächst deren Verhalten in weiteren Anwendungen untersucht werden. Dabei sollte analysiert werden, ob die Additive tatsächlich die Tau-Protein-Aggregation inhibierten oder der inhibitorische Effekt auf andere Umstände zurückzuführen war.

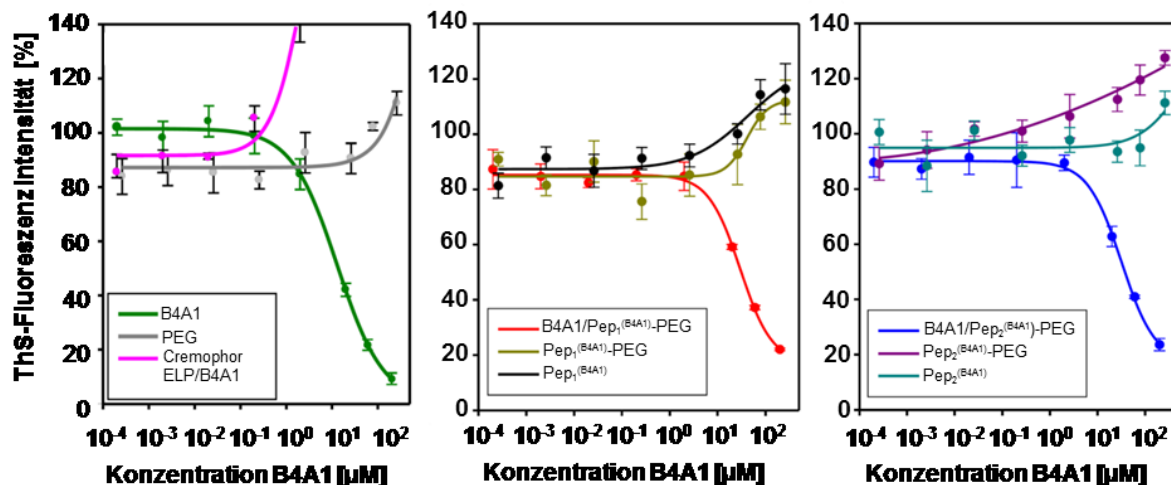
#### Dosis-Wirkungs-Experimente: Bestimmung von DC<sub>50</sub>-Werten

Neben der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation war auch die Deaggregation bereits gebildeter K19-Tau-Protein-Aggregate eine Anforderung an einen potentiellen anti-AD-Wirkstoff. In einem anti-AD-Medikament könnte diese Eigenschaft nicht nur dem Krankheitsverlauf vorbeugen, sondern auch die Pathologie der Krankheit nachhaltig beeinflussen. Deshalb wurden zusätzlich Dosis-Wirkungs-Experimente im Konzentrationsbereich von 200 pM bis 200 μM bezogen auf die B4A1-Konzentration für B4A1, PEG, die Komplexe B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, die Konjugate Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, sowie die Peptide Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup> durchgeführt (**Abb. 50**).

Innerhalb dieser Versuchsreihe traten lediglich bei B4A1 und den wirkstoffbeladenen Komplexen deaggregierende Effekte auf. Die DC<sub>50</sub>-Werte von 31.1 μM für B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und 37.5 μM für B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG waren vielversprechend und mit dem DC<sub>50</sub>-Wert von 13.5 μM für B4A1 allein (unter Zusatz von DMSO) vergleichbar. Während Referenzmessungen mit PEG keinen disassemblierenden Effekt auf bereits gebildete Tau-

Protein-Aggregate hatten, induzierten die Wirkstoffkomplexe des Kontroll-Formulierungsadditivs Cremophor ELP weitere Aggregate.<sup>[8b, 8c]</sup>

Interessanterweise zeigten die Referenzmessungen für die Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG, sowie die Peptide  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$  und  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  im Gegensatz zu den Inhibitionsexperimenten (vgl. Tab. 6) keine deaggregierende Wirkung (Tab. 7). Das könnte ein Indiz für die Wirkstofffreisetzung aus den Wirkstoff-Konjugat-Komplexen sein, da die Trägersubstanzen ohne B4A1 offenbar keinen Effekt auf die Tau-Protein-Deaggregation hatten. Dieses gegenteilige Verhalten der Komplexe, Konjugate und Peptide im Inhibitions- und Deaggregationsassay wird im folgenden, heparinfreien Ansatz ausführlich diskutiert.



**Abb. 50.** Ermittlung des Deaggregationsgrades der Tau-Protein-Aggregate des Konstrukts K19 in einem Dosis-Wirkungs-Experiment mit B4A1-Systemen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung. Betrachtet wurden hierbei B4A1 allein unter Zusatz von DMSO, PEG, die Komplexe  $\text{B4A1/Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$ -PEG, Cremophor ELP/B4A1, die Konjugate  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$ -PEG, sowie die Peptide  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$ . (Bedingungen:  $[\text{B4A1}; \text{B4A1/Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}] = 200 \text{ pM-}200 \text{ µM}$ ,  $[\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}; \text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}; \text{PEG}] = 260 \text{ pM-}260 \text{ µM}$ ,  $[\text{K19}] = 10 \text{ µM}$  in  $50 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$ ,  $[\text{Heparin}_{3000}] = 2.5 \text{ µM}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6.8$ ).<sup>[8b, 8c]</sup>

Die etwas geringere Wirksamkeit der Komplexe im Vergleich zu B4A1 allein war vermutlich der indirekten Wirkungsweise der Komplexe mit dem Target zuzuschreiben. Während B4A1 allein direkt mit dem Tau-Protein wechselwirken konnte, war das Dreikomponentensystem des Wirkstoff-Peptid-PEG-Komplexes zunächst auf die Freisetzung von B4A1 aus dem Komplex angewiesen, bevor die Deaggregation der Protein-Aggregate erfolgen konnte. Offenbar erfolgte die Wirkstoffabgabe ohne merkliche Beeinträchtigungen. Sie schien abhängig von der Peptidsequenz im Komplex zu funktionieren, da das System  $\text{B4A1/Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG einen weniger starken deaggregierenden Effekt als das System  $\text{B4A1/Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG aufwies. Die in den Komplexen enthaltenen Peptidsequenzen FFHHKKK ( $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ ) und RKHFNTF ( $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ ) unterscheiden sich vor allem in der Anzahl basischer Aminosäuren – fünf im Fall von  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$  und drei im Fall von  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ . Auch das Auftreten der aromatischen Aminosäure Phe ist unterschiedlich. Während Phe im Peptid  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$  blockartig vorkommt, sind die zwei Phe-Reste im Peptid  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  durch die polaren Aminosäuren Asn und Thr voneinander getrennt. Insgesamt schien dadurch im

Komplex B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG eine etwas stärkere Wirkstoff-Transporter-Bindung als im Komplex B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG vorzuliegen. Dies unterstützt auch die durch die Computersimulationen (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 4**) erhaltenen Erkenntnisse, nach denen im Komplex B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG durchschnittlich mehr  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen und Freiheitsgrade als im Komplex B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG möglich waren.

**Tab. 7.** Zusammenfassung der DC<sub>50</sub>-Werte für die Dosis-Wirkungs-Experimente der Tau-Protein-Aggregation für das Tau-Protein-Konstrukt K19.

Substanz	DC <sub>50</sub> -Wert [ $\mu$ M]
B4A1	13.5
PEG	nicht messbar
Cremophor ELP/B4A1	nicht messbar
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup>	nicht messbar
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	nicht messbar
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	31.1
Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup>	nicht messbar
Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	nicht messbar
B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	37.5

So konnten in den Dosis-Wirkungs-Experimenten gute Deaggregationseffekte von Tau-Aggregaten für die untersuchten B4A1-Komplexe erhalten werden. Die Wirksamkeiten waren vergleichbar mit dem potentiellen Wirkstoff B4A1 allein ohne Konjugatzusatz. Die Referenzexperimente mit dem klinisch eingesetzten, unspezifisch bindenden Löslichkeitsvermittler Cremophor ELP zeigten keine positive Wirkung hinsichtlich der Deaggregation der Tau-Aggregate, sondern verstärkte die Aggregation sogar. Alle Konjugate und Peptide der untersuchten B4A1-Komplexe zeigten ohne Wirkstoffbeladung wie gewünscht keine deaggregierende Wirkung. Offenbar zeichnete sich hier ein deutlicher Unterschied zu den Experimenten der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation ab (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1 und 2**). In diesen Versuchen hatten die Trägersubstanzen und Peptide einen direkten Einfluss auf die Inhibition. Im folgenden Abschnitt soll dieser Umstand näher beleuchtet werden.

#### Heparinfreier Ansatz: Dosis-Wirkungs-Experimente zur Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten

In einem Biotest sollten die Solubilisatoren von potentiellen Wirkstoffen selbst keinen Einfluss auf den Test oder dessen Komponenten haben. Für die untersuchten Systeme B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG zeigten die Bestandteile des Löslichkeitsvermittlersystems, d. h. die Konjugate und Peptide, einen inhibitorischen Effekt auf die Aggregation des Tau-Proteins. Im Gegensatz dazu zeigten nur die Wirkstoff-Konjugat-Komplexe eine Wirkung beim Biotest der Deaggregation von Tau-Protein-

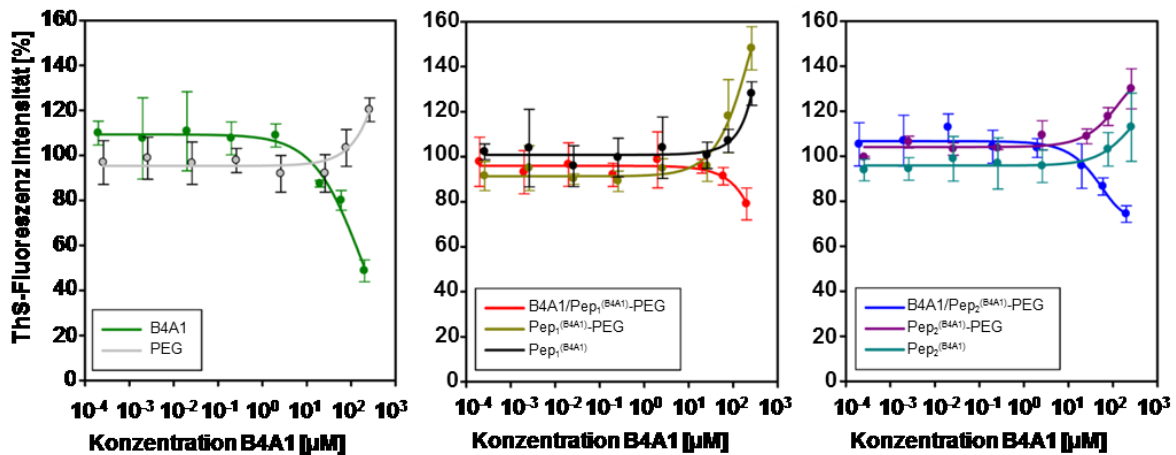
Aggregaten. Die zugehörigen Konjugate und Peptide förderten die Deaggregation nicht. Somit lag die Vermutung nahe, dass die Konjugate und Peptide nicht mit dem Tau-Protein, sondern mit einem anderen Bestandteil des Biotests wechselwirkten, der im Inhibitionversuch eingesetzt wurde, jedoch nicht im Deaggregationstest. Hierfür kam vor allem das Polyanion Heparin in Frage, das im herkömmlichen zellfreien K19-Inhibitionsversuch eingesetzt wurde, um die Aggregation des normalerweise sehr gut wasserlöslichen Tau-Monomers zu induzieren und zu beschleunigen.

Zur Überprüfung dieser These wurde ein ThS-Inhibitionsassay im Rahmen eines Dosis-Wirkungs-Experiments mit dem Tau-Konstrukt  $\text{Tau}^{4\text{RD}}\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}$  angefertigt. Um einen Inhibitionstest ohne die Zugabe von Heparin durchführen zu können, wurde dieses Tau-Konstrukt mit der Repeat-Domäne mit vier Wiederholungen eingesetzt. Durch das Fehlen eines Lysins an Position 280 war  $\text{Tau}^{4\text{RD}}\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}$  zur alleinigen Aggregation fähig.<sup>[165]</sup> Um zusätzliche Komponenten im Biotest zu vermeiden, mit denen die B4A1-Systeme wechselwirken könnten, wurde ein Tau-Konstrukt mit C→A Mutationen an den Positionen 291 und 322 eingesetzt. Dieses Konstrukt war ohne die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) verwendbar. Üblicherweise wird DTT zugesetzt, um die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken des Tau-Proteins zu unterbinden, da diese die effektive Tau-Protein-Aggregation verhindern würden. Eine weitere Mutation des Konstrukts an Position 260 wurde in einem anderweitigen Biotest benötigt, beeinträchtigt die Aggregation des Tau-Proteins jedoch nicht. Die Dosis-Wirkungs-Experimente wurden im Konzentrationsbereich von 200 pM bis 200 µM, bezogen auf die B4A1-Konzentration für B4A1, PEG, die Komplexe  $\text{B4A1/Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$ -PEG, die Konjugate  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$ -PEG, sowie die Peptide  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$  durchgeführt (**Abb. 51**).<sup>[164]</sup>

Die Referenzmessung für den Wirkstoff B4A1 allein ergab einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von > 200 µM für die Inhibition des Tau-Konstrukts  $\text{Tau}^{4\text{RD}}\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}$  (unter Zusatz von DMSO). Im Vergleich zur Inhibition des Tau-Konstrukts K19 ( $\text{IC}_{50} \text{ B4A1} = 12.1 \mu\text{M}$ ) (vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1 und 2) waren demnach innerhalb des heparinfreien Versuchs deutlich höhere Wirkstoffkonzentrationen als im herkömmlichen K19-Inhibitionstest für die gleiche inhibitorische Wirkung nötig. Dieser Umstand lässt sich wahrscheinlich auf die strukturellen Unterschiede der Tau-Konstrukte zurückführen. Im Gegensatz zu K19 enthält das Konstrukt  $\text{Tau}^{4\text{RD}}\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}$  die Wiederholungseinheit R2, die eine aggregations-verstärkende Mutation  $\Delta\text{K280}$  aufweist. Um den Aggregationseffekt von R2 im heparinfreien Ansatz zu inhibieren und die gleiche Wirksamkeit von B4A1 wie im herkömmlichen Test mit K19 zu erreichen, muss folglich im heparinfreien Ansatz eine höhere Wirkstoffdosis eingesetzt werden. Auch die unterschiedlichen pH-Werte und Pufferbedingungen der herkömmlichen und heparinfreien Biotests trugen vermutlich zu den unterschiedlichen  $\text{IC}_{50}$ -Werten bei.

Durch Inkubation der  $\text{Tau}^{4\text{RD}}\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}$ -Konstrukte mit den Komplexen  $\text{B4A1/Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG oder  $\text{B4A1/Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG wurden inhibitorische Effekte mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von > 200 µM beobachtet, vergleichbar mit B4A1 allein (unter Zusatz von DMSO). Im Gegensatz dazu wurden durch Einsatz der zugehörigen Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG oder den Peptiden  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG und  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  keine inhibitorischen Wirkungen im heparinfreien  $\text{Tau}^{4\text{RD}}\Delta\text{K280}$ -Aggregations-Biotest erzielt (**Tab. 8**).





**Abb. 51.** Ermittlung des Inhibitionsgrades der Tau-Protein-Aggregation des Konstrukts  $\text{Tau}^{4\text{RD}}_{\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}}$  in einem Dosis-Wirkungs-Experiment für B4A1, PEG,  $\text{B4A1/Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$ ,  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$  und  $\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung. (Bedingungen:  $[\text{B4A1}; \text{B4A1/Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}] = 200 \text{ pM}-200 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $[\text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}; \text{Pep}_{1-2}^{(\text{B4A1})}; \text{PEG}] = 260 \text{ pM}-260 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $[\text{Tau}^{4\text{RD}}_{\Delta\text{K280}}] = 10 \text{ }\mu\text{M}$  in PBS-Puffer,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ).<sup>[164]</sup>

**Tab. 8.** Übersicht der ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte im Dosis-Wirkungs-Experiment der Tau-Protein-Aggregation für das Tau-Protein-Konstrukt  $\text{Tau}^{4\text{RD}}_{\Delta\text{K280\_C291A\_C322A\_I260C}}$ .

Substanz	$\text{IC}_{50}$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]
B4A1	> 200
PEG	nicht messbar
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$	nicht messbar
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$	nicht messbar
$\text{B4A1/Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$	> 200
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$	nicht messbar
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$	nicht messbar
$\text{B4A1/Pep}_2^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$	> 200

Um dieses gegensätzliche Verhalten im Vergleich zum herkömmlichen Inhibitionstest von K19 (vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1 und 2) nachvollziehen zu können, musste zunächst berücksichtigt werden, dass die peptidischen Anteile der Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$  und  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$  mit den Sequenzen FFHHKKK und RKHFNTF stark basischer Natur sind. Diese Eigenschaft ging von den Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin aus, deren Seitenketten pKs-Werte von 12.10, 10.67 und 6.04 aufweisen.<sup>[166]</sup> Da die vorliegenden Biotests bei einem pH-Wert von 6.8 durchgeführt wurden, lagen die Aminosäuren Arginin und Lysin unter diesen Bedingungen in protonierter Form als Kationen vor. Histidin hingegen als schwächere Base stand vermutlich nur zu einem geringen Teil als Kation zur Verfügung.

Demzufolge lagen wahrscheinlich ca. drei positive Ladungen pro Konjugat  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG und Peptid  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$  und ca. zwei positive Ladungen pro Konjugat  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG und Peptid  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$  in den Tests vor. Elektrostatische Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den positiv geladenen Peptideinheiten und den negativ geladenen Heparinmolekülen, die im Inhibitionstest von K19 verwendet wurden, waren damit durchaus denkbar. Dies würde zu der Entfernung von Heparinmolekülen aus dem herkömmlichen Biotest führen. Die Peptide hätten in einem solchen Mechanismus keine inhibitorische Wirkung auf die Tau-Protein-Aggregation selbst, sondern würden lediglich die Aggregation des Proteins durch das Abfangen von Heparin unterbinden.

Umso realistischer erschien diese Annahme, da insgesamt eine Großzahl positiv geladener Peptidmoleküle im Verhältnis zu den vorhandenen negativen Ladungen des verwendeten Polyanions Heparin auftraten. Heparin wurde im herkömmlichen Inhibitionsansatz in einer Konzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Bei einem Molekulargewicht von 3000 Da enthält Heparin ca. 16 Zuckereinheiten und ca. 27 negative Ladungen pro Molekül.<sup>[167]</sup> Im Konzentrationsbereich des Inhibitionsassays, in denen die Peptide und Konjugate einen hohen inhibitorischen Effekt zu haben schienen, wurden die Biomoleküle in einer Konzentration von 260  $\mu\text{M}$  verwendet. Dementsprechend lag für diesen Messpunkt ein molekulares Verhältnis zwischen Heparin und Peptid, bzw. Konjugat von 1:96 vor. Mit je drei, bzw. zwei positiven Ladungen pro Peptid oder Konjugat ergab sich ein Ladungsverhältnis von ca. 27 negativen Ladungen des Heparins zu ca. 288 positiven Ladungen für  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ , bzw. zu ca. 192 positiven Ladungen für  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ .

Somit könnte es im K19-Inhibitionstest (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1 und 2**) durchaus zu den beschriebenen Wechselwirkungen zwischen dem Polyanion Heparin und den positiv geladenen Funktionalitäten der Peptide kommen, sodass ein Teil des im Assay verwendeten Heparins blockiert war und nicht mehr in den Aggregationsprozess von  $\text{Tau}^{3\text{RD}}$  *in vitro* eingreifen und die Aggregation fördern konnte. Auf derartige Weise könnte ein inhibitorischer Effekt imitiert werden. Im heparinfreien Inhibitionsansatz (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 4**) würde sich ein solcher Mechanismus nicht ergeben, was in Übereinstimmung mit den vorliegenden Messungen stand. Auch im Tau-Deaggregationstest (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 3**) spielte die Wirkungsweise von Heparin keine Rolle, da die potentiellen Wirkstoffe hierbei mit bereits gebildeten Tau-Aggregaten wechselwirken sollten. Somit erscheint es sinnvoll, dass sich im Deaggregationstest auch keine Effekte der Peptide, bzw. Konjugate auf die Deaggregation des Tau-Proteins messen ließen.

Diese Erkenntnisse wurden auf Grundlage der vier vorangehenden Biotests (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitte 1-4**) gewonnen und in **Abb. 52** zusammengefasst.<sup>[164]</sup>

#### Übersicht der zellfreien Biotests der B4A1-Systeme

Inhibitionsbiotest konstante B4A1-Konzentration			Inhibitionsbiotest Dosis-Wirkungs-Experiment Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte		
System	Komponente	Wirkung	System	Komponente	Wirkung
Wirkstoff	B4A1	✓	Wirkstoff	B4A1	✓
B4A1-Komplexe	B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓	B4A1-Komplexe	B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓
	B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓		B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓
B4A1-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓	B4A1-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓
	Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓		Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓
			B4A1-Peptide	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup>	✓ (✓)

Deaggregationsbiotest Dosis-Wirkungs-Experiment Bestimmung der $DC_{50}$ -Werte			Heparinfreier Inhibitionsbiotest Dosis-Wirkungs-Experiment Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte		
System	Komponente	Wirkung	System	Komponente	Wirkung
Wirkstoff	B4A1	✓	Wirkstoff	B4A1	✓
B4A1-Komplexe	B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓	B4A1-Komplexe	B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓
	B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓		B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓
B4A1-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✗	B4A1-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✗
	Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✗		Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✗
B4A1-Peptide	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup>	✗	B4A1-Peptide	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup>	✗
	Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup>	✗		Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup>	✗

**Abb. 52.** Zusammenfassung der zellfreien Biotests für B4A1-Systeme. Die Wirksamkeiten von B4A1, B4A1-Komplexen, B4A1-Konjugaten und den zugehörigen Peptiden hinsichtlich der Tau-Protein-Aggregation wurden dargestellt.

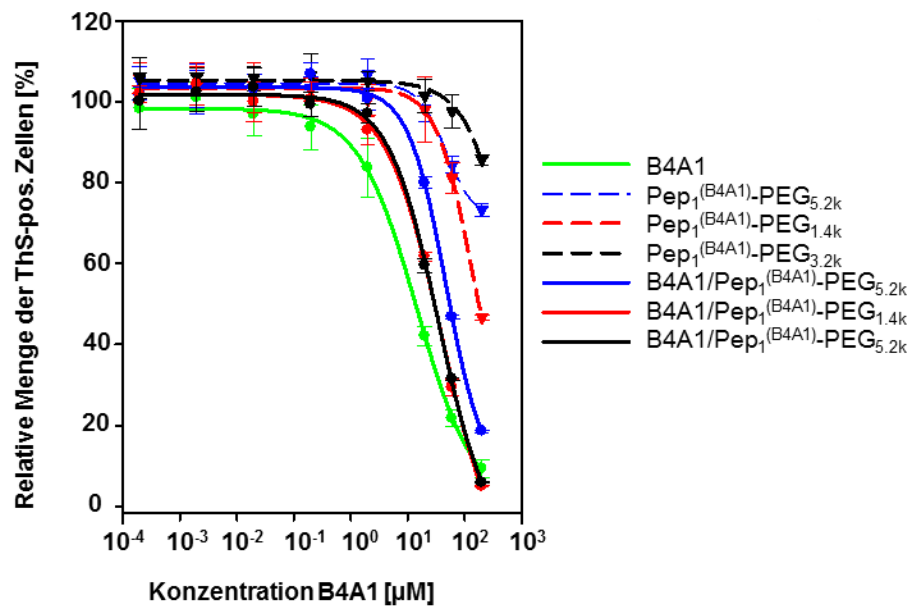
#### Einfluss der PEG-Block-Länge auf die Dosis-Wirkungs-Experimente zur Bestimmung von $IC_{50}$ -Werten

In den vorhergehenden Abschnitten konnte die Wirksamkeit der B4A1-Komplexe auf die Tau-Protein-Deaggregation erfolgreich bewiesen werden. Die Systeme erreichten  $DC_{50}$ -Werte, die gut mit B4A1 ohne Konjugatzusatz vergleichbar waren. Referenzmessungen mit B4A1-Konjugaten und B4A1-Peptiden zeigten keine Aktivität hinsichtlich der Deaggregation und erfüllten somit die Anforderungen an biologisch geeignete Formulierungsadditive.

Inhibitorische Effekte der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe ließen sich zwar ebenfalls beobachten, es war jedoch nicht eindeutig, ob die Aktivität vom Wirkstoff allein herrührte, da die Konjugate und Peptide allein ohne Wirkstoff ebenfalls gute  $IC_{50}$ -Werte erreichten. Die Vermutung, dass die Biomoleküle nicht in den Inhibitionsmechanismus eingriffen, sondern mit dem aggregationsfördernden Polyanion Heparin wechselwirkten, konnte in einem heparinfreien Inhibitionsbiotest bestätigt werden. In diesem Test zeigten die Komplexe wie gewünscht eine inhibitorische Wirkung, während die Konjugate und Peptide keine Aktivitäten aufwiesen. Demnach setzten die Komplexe den potentiellen Wirkstoff in Gegenwart des Tau-Proteins wahrscheinlich problemlos frei. Da außerdem kein Zusatz von DMSO für die Untersuchung der wasserlöslichen Komplexe vonnöten war, konnte eine wertvolle Alternative zum bisherigen Einsatz von B4A1 in Verbindung mit dem organischen Lösungsmittel erbracht werden.

Inwiefern die inhibitorische Wirkung der komplexen Systeme von der Länge des PEG-Blocks abhängt, sollte im Folgenden untersucht werden. Möglicherweise könnte ein Wirkstoff-Konjugat-Komplex mit einer anderen PEG-Block-Länge als die hauptsächlich in der Arbeit verwendeten Konjugate mit PEG = 3.2 kDa noch bessere Inhibitionswirkungen entfalten. Dazu wurden exemplarisch Dosis-Wirkungs-Experimente am Beispiel des Tau-Protein-Konstrukts K19 im Konzentrationsbereich von 200 pM bis 200  $\mu$ M bezogen auf die B4A1-Konzentration für B4A1, für die Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>, sowie die Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> durchgeführt (**Abb. 53**).

Durch Inkubation der K19-Konstrukte mit den Komplexen B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> wurden inhibitorische Effekte mit  $IC_{50}$ -Werten von 29.5  $\mu$ M erhalten. Dies war vergleichbar mit der Aktivität von B4A1 unter Zusatz von 2% DMSO mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 13.5  $\mu$ M. Der etwas geringere Effekt der Konjugate resultierte möglicherweise daraus, dass der Wirkstoff erst aus dem Komplex freigesetzt werden musste, bevor er mit dem Tau-Protein interagieren konnte. B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub> mit dem längsten PEG-Segment der getesteten Komplexe konnte B4A1 offenbar am schwierigsten freisetzen, da lediglich ein  $IC_{50}$ -Wert von 53.6  $\mu$ M mit diesem System erzielt wurde. Der PEG-Block könnte hier einen abschirmenden Effekt auf den Wirkstoff haben. Die Referenzmessungen der Konjugate ergaben nur geringe inhibitorische Aktivitäten mit  $IC_{50}$ -Werten von > 200  $\mu$ M für Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub> und Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub>, sowie einem  $IC_{50}$ -Wert von 174.8  $\mu$ M für Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> (**Tab. 9**).<sup>[162]</sup>



**Abb. 53.** Darstellung der Dosis-Wirkungs-Experimente der Tau-Protein-Aggregation des Konstrukts K19 für B4A1 allein unter Zusatz von DMSO, für die Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>, sowie für die Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung. (Bedingungen: [B4A1; B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>] = 200 pM-200 µM, [Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> und Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>] = 260 pM-260 µM, [K19] = 10 µM in 50 mM NH<sub>4</sub>Ac, [Heparin<sub>16000</sub>] = 2.5 µM, 37°C, pH = 6.8).<sup>[162]</sup>

**Tab. 9.** Zusammenfassung der durch verschiedene B4A1-Systeme erzielten IC<sub>50</sub>-Werte im Dosis-Wirkungs-Experiment der Tau-Protein-Deaggregation für das Tau-Protein-Konstrukt K19.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Wert [µM]
B4A1	13.5
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>5.2k</sub>	> 200
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>5.2k</sub>	53.6
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>3.2k</sub>	> 200
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>3.2k</sub>	29.5
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>1.4k</sub>	174.8
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>1.4k</sub>	29.5

Interessanterweise zeigten die Konjugate in diesem Versuch nur sehr geringe inhibitorische Aktivitäten, obwohl zur Aggregation des Tau-Proteins Heparin eingesetzt wurde. Das Polyanion wechselwirkte im herkömmlichen Inhibitionstest von K19 (vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1 und 2) wahrscheinlich mit den protonierten Seitenketten der Peptide und Peptid-PEG-Konjugate. Allerdings wurde im herkömmlichen Test eine Heparinform mit

einem Molekulargewicht von 3000 Da eingesetzt und im hier vorliegenden Test Heparin des Molekulargewichts 16000 Da. Heparin<sub>3000</sub> weist wesentlich weniger negative Ladungen als Heparin<sub>16000</sub> auf, sodass sich im hier aufgezeigten Bioassay andere Verhältnisse zwischen den negativen Ladungen der Heparinmoleküle und den positiven Ladungen der Peptide, bzw. Konjugate (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 4**) als in den vorangehenden Tests (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1-3**) ergaben. Es schienen deutlich weniger elektrostatische Wechselwirkungen oder Ausbildungen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Heparin und den Peptiden oder Konjugaten aufzutreten, sodass weitaus weniger Heparin aus dem Biotest entfernt wurde und im Vergleich stärker zur Tau-Protein-Aggregation beitragen konnte. Auch die unterschiedlichen Molekülgrößen der beiden Heparinformen mit dementsprechend abweichenden sterischen Ansprüchen könnten eine Rolle für die Entstehung der unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werte in den Inhibitionstests mit Heparin<sub>16000</sub> und Heparin<sub>3000</sub> für den Einsatz von Konjugaten und Peptiden spielen.

Insgesamt zeigte das B4A1-Konjugat-System mit einer PEG-Länge von 3.2 kDa die besten Ergebnisse in den verschiedenen untersuchten Anwendungen. So erreichte der Komplex, gemeinsam mit B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, beinahe äquimolare Wirkstoff:Transporter-Verhältnisse von 1:1.2 (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 1 und 3**). B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> erzielte lediglich ein Verhältnis von 1:3.4 (B4A1/Konjugat). Zudem zeigte der Komplex B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> mit R<sub>h</sub> = 105 nm eine vorteilhafte Größe im Vergleich zu B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, der mit R<sub>h</sub> = 200 nm deutlich größere Aggregate ausbildete, die in Folgeanwendungen nur schwer einzusetzen wären (**vgl. Kapitel 3.2.1., Abschnitt 2**). Der Komplex B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> mit einem R<sub>h</sub> = 100 nm zeigte hier nur eine geringfügige Verkleinerung der Komplexsysteme in Bezug auf B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub>, die in Folgeanwendungen höchstwahrscheinlich keine Auswirkungen hätte. Da das B4A1-Konjugat-System mit einer PEG-Länge von 3.2 kDa auch im vorliegenden Biotest gemeinsam mit B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub> die besten Ergebnisse mit IC<sub>50</sub>-Werten von 29.5 µM erzielte, schien eine PEG-Länge mit 3.2 kDa optimal für die genutzten Anwendungen zu funktionieren. Auch in Bezug auf die Materialkosten war dieses Konjugat deutlich günstiger als das mit einer PEG-Länge von 5.2 kDa. Während B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>3.2k</sub> eine Beladungskapazität von 81 mg B4A1 pro Gramm Konjugat erzielte, ließen sich durch B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub> nur 55 mg Wirkstoff pro Gramm Konjugat solubilisieren.

### **3.4.2. In vitro N2a-Zellversuche zum N-Phenylamin B4A1**

Die zellfreien Biotests für die B4A1-Komplexe brachten vielseitige Erkenntnisse. Sehr gute deaggregierende Effekte und gute inhibitorische Wirkungen konnten für die Tau-Protein-Aggregation erzielt werden. Zudem konnte das vermeintliche Eingreifen der Konjugate und zugehörigen Peptide in den Biotest widerlegt werden. Die Durchführung eines heparinfreien Biotests ergab, dass Konjugate und Peptide wahrscheinlich mit dem Polyanion Heparin wechselwirkten. Dieses wurde zur Induzierung der Tau-Protein-Aggregation eingesetzt. Unter den Bedingungen des Biotests lagen die basischen Peptidsequenzen der B4A1-Systeme vermutlich positiv geladen vor und konnten so möglicherweise ionische Wechselwirkungen mit Heparin eingehen. Weniger Heparin würde dadurch für die Aggregationsinduzierung zur Verfügung stehen. Auf diese Weise würde ein inhibitorischer

Effekt durch Konjugate und Peptide imitiert werden. Auch der Einfluss der PEG-Block-Länge der Konjugate auf die Tau-Protein-Aggregation wurde exemplarisch für einen B4A1-Komplex untersucht. Konjugat-Komplexe mit PEG-Längen von 3.2 kDa und 1.4 kDa erzielten die besten Effekte. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollten im nachfolgenden Teil der Arbeit die inhibitorischen Effekte der B4A1-Komplexe in N2a-Zelltests ermittelt werden.

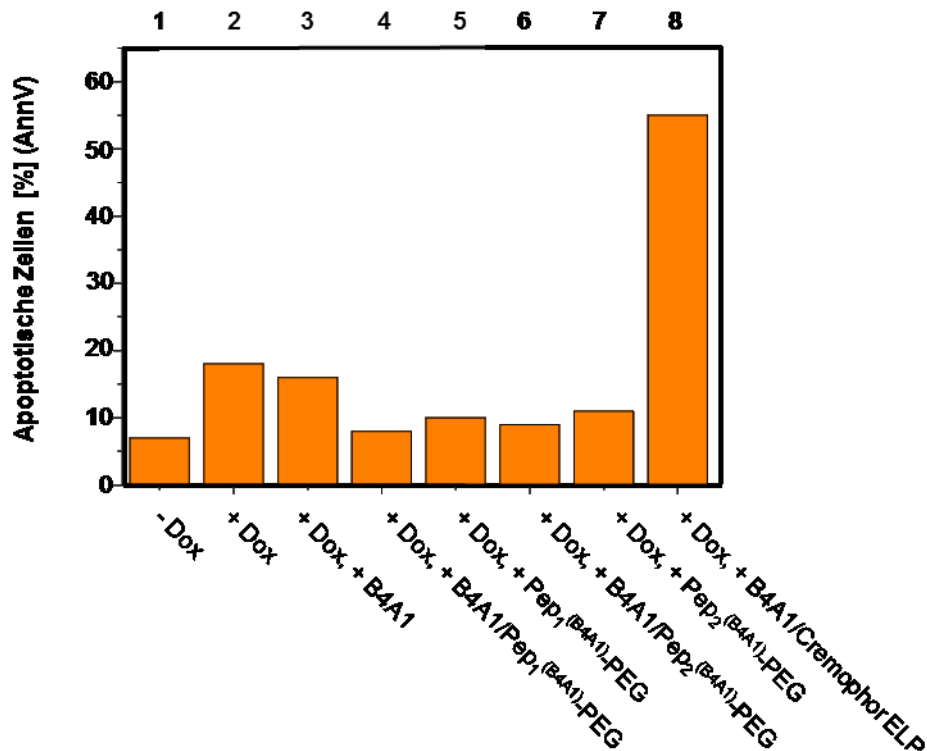
Idealerweise sollten die Peptid-Polymer-Konjugate nicht nur für die effektive Solubilisierung der Wirkstoffe sorgen, sondern auch geringe Toxizitäten und im besten Fall einen positiven Effekt auf die Zellviabilität haben. Diesen Fragestellungen wurden die B4A1-Komplexe zunächst unterzogen (Durchführung der Experimente: M. Pickhardt (Arbeitsgruppe E. Mandelkow, DZNE, Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, GER)).

#### Toxizitätsuntersuchungen

Im Rahmen eines Annexin V (AnnV)-Tests wurde die Wirkung der B4A1-Konjugat-Komplexe und der zugehörigen Konjugate auf N2a-Zelllinien studiert. Ein Indikator für die frühe Zellapoptose ist die Verlagerung von Phosphatidylserin (PS). Dieses Phospholipid befindet sich normalerweise an der Innseite der Zellplasmamembran und klappt im Fall der Zellapoptose an die Außenschicht der Membran. Durch die spezifische Bindung des Proteins AnnV an PS können apoptotische Zellen nachgewiesen werden.<sup>[168]</sup> In den vorliegenden Versuchen erfolgte die Quantifizierung apoptotischer Zellen durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). Ermittelt wurde dabei die Menge an AnnV-positiven Zellen. Das Protein AnnV wurde für die Messungen durch ein Fluoreszenz-Label versehen.

So wurde durch die Zugabe von Doxycyclin (Dox) zunächst die Expression des Tau-Proteins Tau<sup>4RDΔK280</sup> gewährleistet. Im Anschluss an die Inkubation der N2a-Zellen mit den B4A1-Systemen erfolgte die Anfärbung apoptotischer Zellen durch AnnV. Für die Ermittlung umfangreicher Erkenntnisse wurden sowohl B4A1, PEG, als auch die Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, B4A1/CremophorELP, sowie die Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG im AnnV-Test eingesetzt (**Abb. 54**).

Bei der B4A1-behandelten Referenzmessung (**Abb. 54, Spalte 3**) traten 16% Zellapoptose auf, während die Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG geringere Toxizitäten mit Apoptosewerten von 8-12% zeigten (**Abb. 54, Spalte 4-7**). Eine weitere Referenzmessung des Komplexes B4A1/Cremophor ELP mit einem Apoptosewert von 55% bewies die gute Verträglichkeit der B4A1-Konjugat-Komplexe im Vergleich zum kommerziellen Löslichkeitsvermittler. Möglicherweise zeigte Cremophor ELP eine deutlich höhere Toxizität, da aufgrund der geringen Wirkstoffkapazität ein sehr hoher Anteil des Solubilisators eingesetzt werden musste.<sup>[8b, 8c]</sup>



**Abb. 54.** Übersicht des AnnV-Tests an N2a-Zelllinien. Durch Zugabe von Dox erfolgte die Exprimierung von Tau<sup>4RDΔK280</sup> in den Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit B4A1, den Komplexen B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Cremophor ELP, sowie den Konjugaten Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG wurden apoptotische Zellen durch AnnV angefärbt. (Bedingungen: Anregungswellenlänge = 633 nm, Emissionswellenlänge = 650-670 nm, 30 000 Messungen pro Probe mit einer Standardabweichung < 1%).<sup>[8b, 8c]</sup>

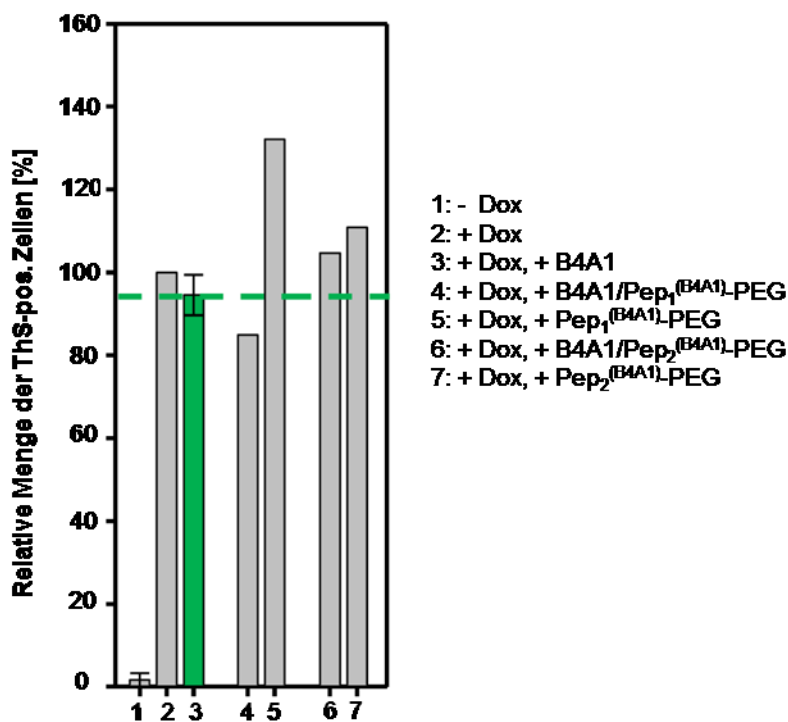
Somit konnten geringe N2a-Zelltoxizitäten für alle B4A1-Komplexe und die zugehörigen Konjugate nachgewiesen werden. Die Werte AnnV-positiver Zellen lagen zudem deutlich unter den Kontrollmessungen der wirkstoffunbehandelten und der mit B4A1 inkubierten Proben. Von Interesse war nun, wie sich die Versetzung Tau-exprimierender N2a-Zellen mit B4A1-Komplexen auf die Tau-Protein-Aggregation auswirken würde.

#### Inhibition der Tau-Protein-Aggregation

Im Folgenden wurde die inhibitorische Wirkung des potentiellen Wirkstoffs B4A1, der Komplexe B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, sowie der Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG in dem kürzlich etablierten N2a-Zellmodell von AD auf die Aggregation des Tau-Proteins untersucht.<sup>[66]</sup> Die Exprimierung des Tau-Proteins Tau<sup>4RDΔK280</sup> wurde durch die Zugabe von Dox gewährleistet. Durch das Zytometrieverfahren FACS erfolgte die Quantifizierung der inhibitorischen Wirkung. Zellen mit aggregiertem Tau-Protein wurden dabei durch Inkubation mit ThS visualisiert (**Abb. 55**).



Im Vergleich zur wirkstoffunbehandelten Referenzmessung (**Abb. 55, Spalte 2**) zeigte B4A1 allein unter Zusatz von DMSO nur einen sehr schwachen inhibitorischen Effekt von ca. 5% (**Abb. 55, Spalte 3**). Auch die Inkubation der N2a-Zellen mit den B4A1-Konjugat-Komplexen zeigte kaum Wirkung, lediglich das System B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG hatte mit ca. 15% weniger ThS-positiven Zellen verglichen mit der Referenzmessung einen leichten Verbesserungseffekt (**Abb. 55, Spalte 4**). Der Komplex B4A1/Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, erhöhten den Anteil an ThS-positiven Zellen sogar (**Abb. 55, Spalten 5-7**). Möglicherweise traten hier komplexe Vorgänge in den Zellen auf, die zu weiterer Tau-Protein-Aggregation führten. Dass die Konjugate dabei einen größeren aggregierenden Effekt als die Komplexe hatten, könnte mit den unterschiedlichen Größen der Systeme im Zusammenhang stehen. Die molekular gelösten Konjugate könnten wahrscheinlich leichter als die zugehörigen Komplexe in die Zellen gelangen. Auch unterschiedliche Aufnahmewege von Komplexen und Konjugaten z. B. aufgrund von unterschiedlichen sterischen Ansprüchen oder Ladungsverteilungen wären durchaus denkbar.



**Abb. 55.** Ermittlung des Inhibitionsgrades der Tau-Protein-Aggregation in einem N2a-Zellmodell für B4A1, für die Komplexe B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und die Konjugate Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG. Durch Zugabe von Dox konnte die Tau<sup>4RΔ</sup>K280-Exprimierung gewährleistet werden. Die Quantifizierung ThS-positiver Zellen erfolgte mithilfe von FACS und wurde auf die wirkstoffunbandelte Probe (Spalte 2) normiert. (Bedingungen: [B4A1; B4A1/Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG] = 30 μM, [Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG] = 54 μM, [Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG] = 48 μM).<sup>[164]</sup>

So ließen sich allgemein betrachtet zwar geringe Toxizitäten der B4A1-Systeme für die Anwendung in N2a-Zellen nachweisen, der Effekt auf die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation war jedoch nur in sehr geringem Maß ersichtlich (**Abb. 56**). Eine Modifizierung der B4A1-Konjugat-Komplexe wäre in diesem Fall erstrebenswert.

Die recht hohe Dynamik der B4A1-Komplexe (vgl. **Kapitel 3.2.1., Abb. 28**) könnte z. B. Auswirkungen auf den Grad der Zellpenetration haben, da sie möglicherweise den Aufnahmemechanismus in die Zellen stört. So könnte z. B. eine Endozytose, die nach einem bestimmtem Ligand-Rezeptor-Mechanismus erfolgt,<sup>[169]</sup> durch die erschwerte Erkennung des Liganden nur gehindert ablaufen, da die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens zwischen geeignetem Rezeptor der Zelle und dem passenden Ligand recht gering wäre. Ein starreres Komplexsystem wie für die Rhodanin-Komplexe vorgeschlagen (vgl. **Kapitel 3.2.2., Abb. 39**) könnte evtl. von den Zellen leichter erkannt und eingeschleust werden. Auch die Größe der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe könnte eine Rolle für die nur geringen Inhibitionsaktivitäten spielen, da die wesentlich kleineren Konjugate allein offenbar eine etwas höhere Zellpermeabilität aufwiesen.

Toxizitätsuntersuchungen			Inhibition der Tau-Protein-Aggregation in N2a-Zellen		
System	Komponente	Geringe Toxizität	System	Komponente	Wirkung
Wirkstoff	B4A1	✓	Wirkstoff	B4A1	geringe Inhibition
B4A1-Komplexe	B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓ ✓	B4A1-Komplexe	B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	geringe Inhibition Steigerung der Aggregation
B4A1-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	✓ ✓	B4A1-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	Steigerung der Aggregation Steigerung der Aggregation

**Abb. 56.** Zusammenfassung der N2a-Zelltest-Ergebnisse der B4A1-Systeme. Die Wirksamkeiten von B4A1, den B4A1-Komplexen und den B4A1-Konjugaten wurden auf die Toxizitätswerte und den Grad der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation untersucht.

Um die Rolle der Polaritäten und Ladungen der wirkstoffaffinen Peptidsequenzen in Bezug auf die Tau-Protein-Aggregation besser bewerten zu können, sollten die Rhodanin-Konjugat-Komplexe ebenfalls in Zelltests eingesetzt werden. Da sich sowohl die Wirkstoffe als auch die zugehörigen Konjugate deutlich in ihren Eigenschaften unterscheiden, waren hier auch unterschiedliche Ergebnisse in den Biotests zu erwarten.

### 3.4.3. Zellfreie *in vitro* Untersuchungen zu den Rhodaninen bb17 und bb15

#### Dosis-Wirkungs-Experimente: Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten

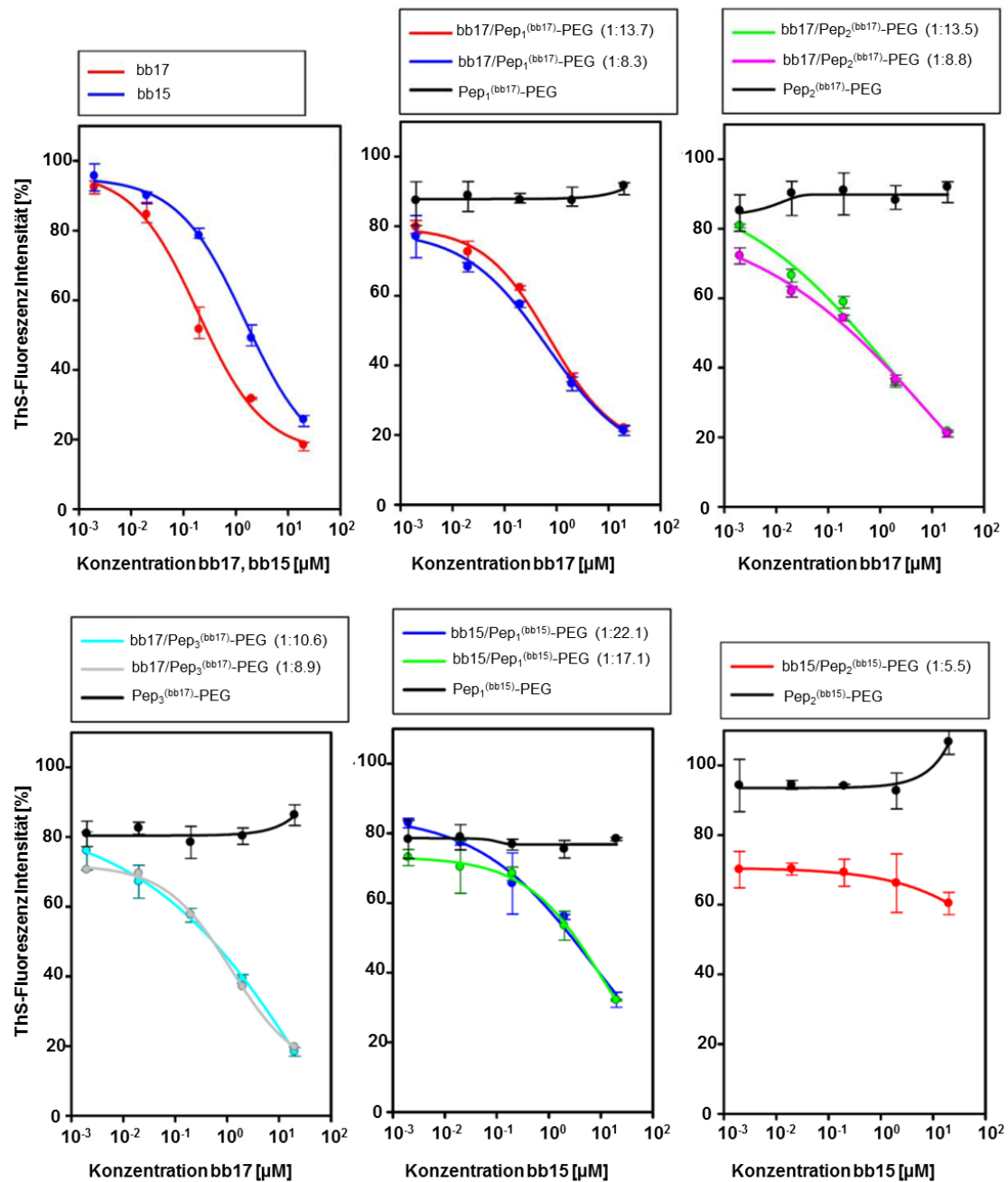
Um nähere Erkenntnisse für die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation in Biotests für eine strukturell andersartige Wirkstoffklasse zu erlangen, wurde auch die Wirkung der Rhodanin-Konjugat-Komplexe in zellfreien *in vitro* Biotests untersucht (Durchführung der Untersuchungen durch M. Pickhardt (Arbeitsgruppe E. Mandelkow, DZNE, Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, GER)). Von großem Interesse war dabei, wie sich die stark hydrophoben Wirkstoffe der Klasse der Rhodanine im Gegensatz zum etwas besser wasserlöslichen *N*-Phenylamin B4A1 in ihren Komplexen verhielten. Der Einfluss der

überwiegend neutralen rhodanin-affinen Peptidsequenzen der Konjugate lieferte ebenfalls einen anderen Ausgangspunkt für die inhibitorische Wirkung der Komplexe.

Die Dosis-Wirkungs-Experimente wurden im Konzentrationsbereich von 2 nM bis 20  $\mu$ M bezogen auf die bb17-, bzw. bb15-Konzentration für bb17, bb15, die Komplexe bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG durchgeführt (**Abb. 57**). Zur Induzierung der Tau-Protein-Aggregation diente Heparin<sub>3000</sub>. Der Konzentrationsbereich der Wirkstoffe lag hier deutlich unter dem für die B4A1-Systeme verwendeten (**vgl. Kapitel 3.4.1.**), da die Rhodanine generell eine stärkere Aktivität bezüglich der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation aufwiesen.

Die Kontrollmessungen von bb17 und bb15 allein ergaben sehr niedrige IC<sub>50</sub>-Werte von 0.3  $\mu$ M und 2.0  $\mu$ M (unter Zusatz von DMSO). Alle eingesetzten bb17-Konjugat-Komplexe erzielten ebenfalls herausragende inhibitorische Wirkungen mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 0.3 und 0.6  $\mu$ M. Ihr Inhibitionseffekt war damit in jedem Fall vergleichbar mit dem Wirkstoff bb17 allein, d.h. das Wirkstoffmolekül wurde offenbar wie gewünscht aus dem Komplex freigesetzt. Interessanterweise zeigten die Komplexe sehr ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte bei unterschiedlichen Wirkstoff:Konjugat-Verhältnissen im Komplex. So erreichte der Komplex bb17/Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG z. B. bei einem bb17:Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG-Verhältnis von 1:13.7 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0.6  $\mu$ M, während ein bb17:Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG-Verhältnis von 1:8.3 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0.4  $\mu$ M erzielte. Die Konjugate Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG zeigten keine inhibitorische Wirkung auf die Tau-Protein-Aggregation.

Bezüglich der bb15-beladenen Komplexe unterschieden sich die Inhibitionseffekte stark. Der Komplex bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG erzielte unabhängig vom Wirkstoff:Transporter-Verhältnis geringe IC<sub>50</sub>-Werte von 2.8  $\mu$ M und 3.3  $\mu$ M. bb15/Pep<sub>2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG mit dem besten Wirkstoff:Transporter-Verhältnis aller Rhodanin-Komplexe von 1:5.5 hingegen hatte nur eine sehr schwache inhibitorische Wirkung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von > 20  $\mu$ M (**Tab. 10**). Möglicherweise bestand in diesem Komplex eine relativ starke Bindung zwischen Wirkstoff und Konjugat, sodass bb15 in Gegenwart des Tau-Proteins nicht ungehindert freigesetzt werden konnte.<sup>[153]</sup>



**Abb. 57.** Ermittlung des Inhibitionsgrades der Tau-Protein-Aggregation des Konstrukts K19 in einem Dosis-Wirkungs-Experiment für bb17, bzw. bb15 allein unter Zusatz von DMSO, die Komplexe bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG. Dargestellt wurden die Wirksamkeiten der Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmessung. (Bedingungen: [bb17; bb15; bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG; bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG; Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG; Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG] = 2-20 nM, [K19] = 10  $\mu\text{M}$  in 50 mM NH<sub>4</sub>Ac, [Heparin<sub>3000</sub>] = 2.5  $\mu\text{M}$ , 37°C, pH = 6.8).<sup>[153]</sup>

**Tab. 10.** Übersicht der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte im Dosis-Wirkungs-Experiment der Tau-Protein-Aggregation für das Tau-Protein-Konstrukt K19 für bb17- und bb15-Systeme.

Substanz	Wirkstoff:Transporter-Verhältnis	IC <sub>50</sub> -Wert [μM]
bb17	-	0.3
bb15	-	2.0
Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	-	nicht messbar
bb17/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	1:13.7	0.6
bb17/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	1:8.3	0.4
Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	-	nicht messbar
bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	1:13.5	0.4
bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	1:8.8	0.3
Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	-	nicht messbar
bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	1:10.6	0.5
bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	1:8.9	0.5
Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	-	nicht messbar
bb15/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	1:17.1	3.3
bb15/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	1:22.1	2.8
Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	-	nicht messbar
bb15/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	1:5.5	> 20

So erreichten die Rhodanin-Transporter-Komplexe IC<sub>50</sub>-Werte, die nahezu identisch mit den IC<sub>50</sub>-Werten der Wirkstoffe allein unter Zusatz von DMSO waren. Analoge Messungen ohne Zusatz von DMSO zeigten keine messbaren Aktivitäten aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe. Im Vergleich zu den Rhodanin-Komplexen erzielten die Komplexe des *N*-Phenylamins B4A1 geringere Wirksamkeiten als der potentielle Wirkstoff ohne Konjugatzusatz (**vgl. Kapitel 3.4.1., Abschnitt 1 und 2**). Möglicherweise lagen in den B4A1-Komplexen stärkere Wirkstoff-Transporter-Bindungen als in den Rhodaninkomplexen vor, da B4A1 und die B4A1-affinen Peptidsequenzen durch die enthaltenen Carboxylgruppen und basischen Aminosäuren vermehrt ionische Wechselwirkungen ausbilden könnten. Die Rhodanine und die rhodanin-affinen Peptidsequenzen als überwiegend neutrale Moleküle ermöglichten durch das fehlende Potential zu ionischen Bindungen evtl. eine einfachere Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Komplex in Gegenwart des Tau-Proteins. Diese Theorie passt auch zu den geringeren Beladungskapazitäten der Rhodaninkomplexe im Gegensatz zu den B4A1-Komplexen (**vgl. Kapitel 3.2.**).

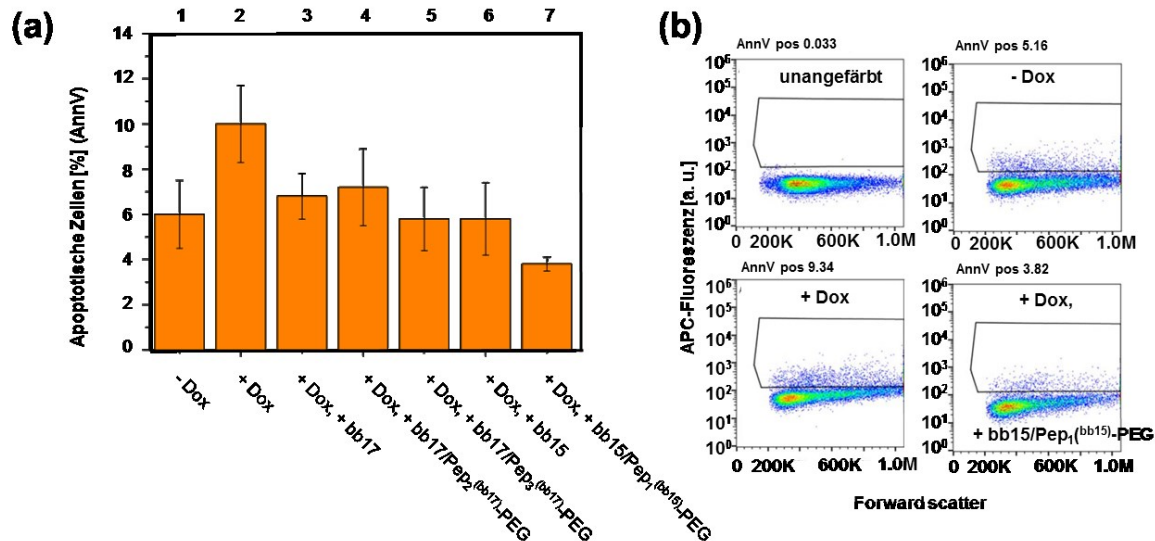
### 3.4.4. In vitro N2a-Zellversuche zu den Rhodaninen bb17 und bb15

#### Toxizitätsuntersuchungen

In zellfreien Biotests der Tau-Protein-Aggregation konnten vielversprechende Wirksamkeiten der Rhodanin-Konjugat-Komplexe nachgewiesen werden (**vgl. Kapitel 3.4.3.**). Darauf basierend sollte im Folgenden die Anwendung der Systeme in N2a-Zelltests erfolgen, da potentielle anti-AD-Wirkstoffe die verstärkte Zellapoptose, die im Verlauf der Krankheit auftritt, verhindern oder zumindest verlangsamen sollten (Durchführung der Untersuchungen durch M. Pickhardt (Arbeitsgruppe E. Mandelkow, DZNE, Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, GER)).

Daher wurden bb17, bb15, die Komplexe bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, bb17/Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG in einem AnnV-Test eingesetzt. Die Tau<sup>4RDAK280</sup>-Expression wurde durch Dox gesteuert und die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte durch FACS. Dafür wurde das spezifisch an apoptotische Zellen bindende AnnV durch Allophycocyanin (APC) markiert (**Abb. 58**). Für das Gating der APC-Fluoreszenz-Fläche wurde eine unangefärbte Referenzmessung genutzt (**Abb. 58b, oben links**). Auf Grundlage dieser Messung konnten die Ermittlungen des Apoptosegrades in uninduzierten Proben (**Abb. 58b, oben rechts**), induzierten Proben (**Abb. 58b, unten links**) und mit bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG behandelten Zellen erfolgen (**Abb. 58b, unten rechts**).

Bezüglich der Referenzmessungen traten ca. 6% apoptotische Zellen ohne die Induzierung der Tau-Protein-Expression (**Abb. 58a, Spalte 1**) und ca. 10% apoptotische Zellen bei dem mit Dox induzierten Expressionsexperiment auf, das zur Tau-Protein-Aggregation führte, (**Abb. 58a, Spalte 2**). Für den Wirkstoff bb17 allein, d.h. unter Zusatz von DMSO, konnte der Apoptosewert der wirkstoffunbehandelten Probe auf ca. 6.8% verringert werden (**Abb. 58a, Spalte 3**). Mit dem Komplex bb17/Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG konnte dieser Effekt sogar auf nur ca. 5.8% apoptotische Zellen noch gesteigert werden (**Abb. 58a, Spalte 5**). bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG erreichte einen guten Wert von ca. 7.2% Zellapoptose (**Abb. 58a, Spalte 4**). Im Vergleich zum Rhodanin bb15 unter DMSO-Einsatz, das zu ca. 5.8% apoptotischen Zellen (**Abb. 58a, Spalte 6**) führte, konnte durch den Komplex bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG eine enorme Verbesserung der Zellviabilität mit nur ca. 3.8% apoptotischen Zellen (**Abb. 58a, Spalte 7**) erreicht werden. Dieser Wert lag sogar deutlich unterhalb der Referenzmessung des natürlichen Zellsterbens von 6%.



**Abb. 58.** (a) Übersicht des AnnV-Tests an N2a-Zelllinien. Durch Zugabe von Dox erfolgte die Expressierung von Tau<sup>4RDΔK280</sup> in den Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit bb17, bb15, sowie den Komplexen bb17/Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG wurden apoptotische Zellen durch AnnV angefärbt und durch FACS quantifiziert. (b) FACS-Messungen von AnnV-APC-positiven, apoptotischen Zellen. Aufgeführt wurden Messungen für eine unangefärbte Probe (oben links), eine uninduzierte Probe (oben rechts), eine Referenzmessung mit exprimiertem Tau<sup>4RDΔK280</sup> (unten links) und eine Messung für den Einsatz des Komplexes bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG (unten rechts). (Bedingungen: Anregungswellenlänge = 633 nm, Emissionwellenlänge = 650-670 nm, 30 000 Messungen pro Probe mit einer Standardabweichung < 1 %).<sup>[153]</sup>

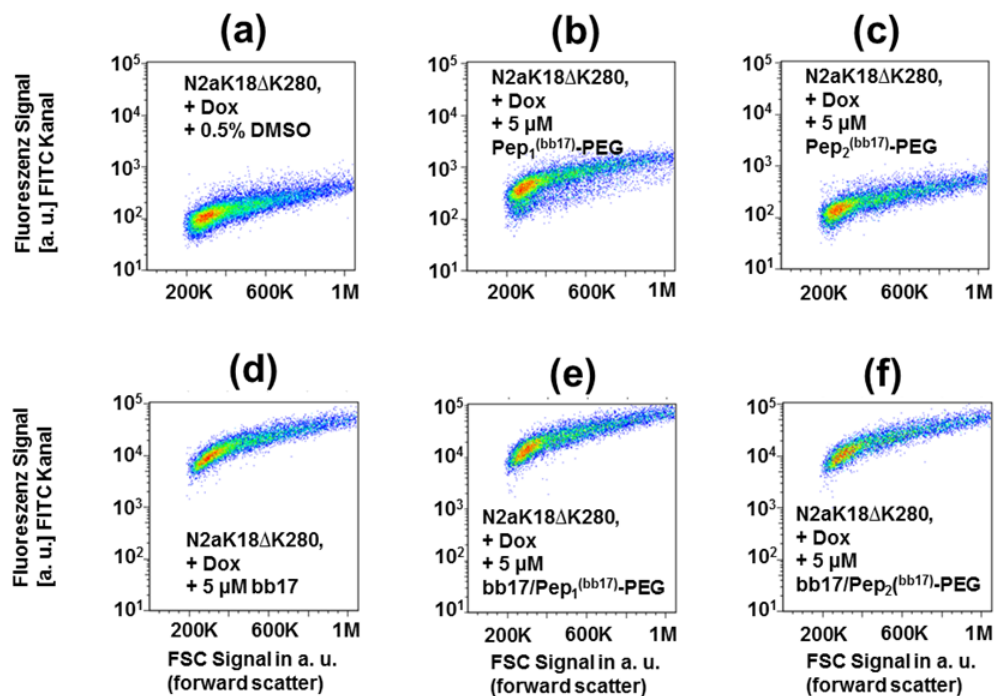
Insgesamt konnten durch die Solubilisierung der potentiellen Wirkstoffe bb17 und bb15 durch Peptid-PEG-Konjugate Komplexe erhalten werden, die einen weitaus stärkeren positiven Effekt auf die Zellviabilität der N2a-Zellen hatten, als die Wirkstoffe allein. Zudem war ein Zusatz von DMSO im Gegensatz zum Einsatz der reinen Wirkstoffe unnötig.<sup>[153]</sup>

#### Inhibition der Tau-Protein-Aggregation

Um herauszufinden, worauf der stark positive Effekt, den die Wirkstoff-Konjugat-Komplexe auf die Zellviabilität (vgl. Kapitel 3.4.4., Abschnitt 1) hatten, zurückzuführen war, wurden weitere Tests im Rahmen des N2a-Zellmodells zur Inhibition der Tau-Protein-Aggregation durchgeführt.<sup>[66]</sup> Untersuchungen erfolgten zu bb17, bb15, den Komplexen bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG, sowie den Konjugaten Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG. Die Expressierung des Tau-Proteins Tau<sup>4RDΔK280</sup> wurde durch die Zugabe von Dox gewährleistet.

Leider war die automatische Quantifizierung der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation in N2a-Zellen durch FACS nicht möglich. Die Inkubation der Zellen mit bb17, bb15, bb17- oder bb15-Komplexen führte zu einem starken Fluoreszenz-Signal der gesamten Zellpopulation bei der Nutzung des FITC-Kanals (Anregung: 495 nm, Emission: 519 nm). Dieses Signal überlagerte das ThS-spezifische Fluoreszenz-Signal, mit dem üblicherweise der Grad der

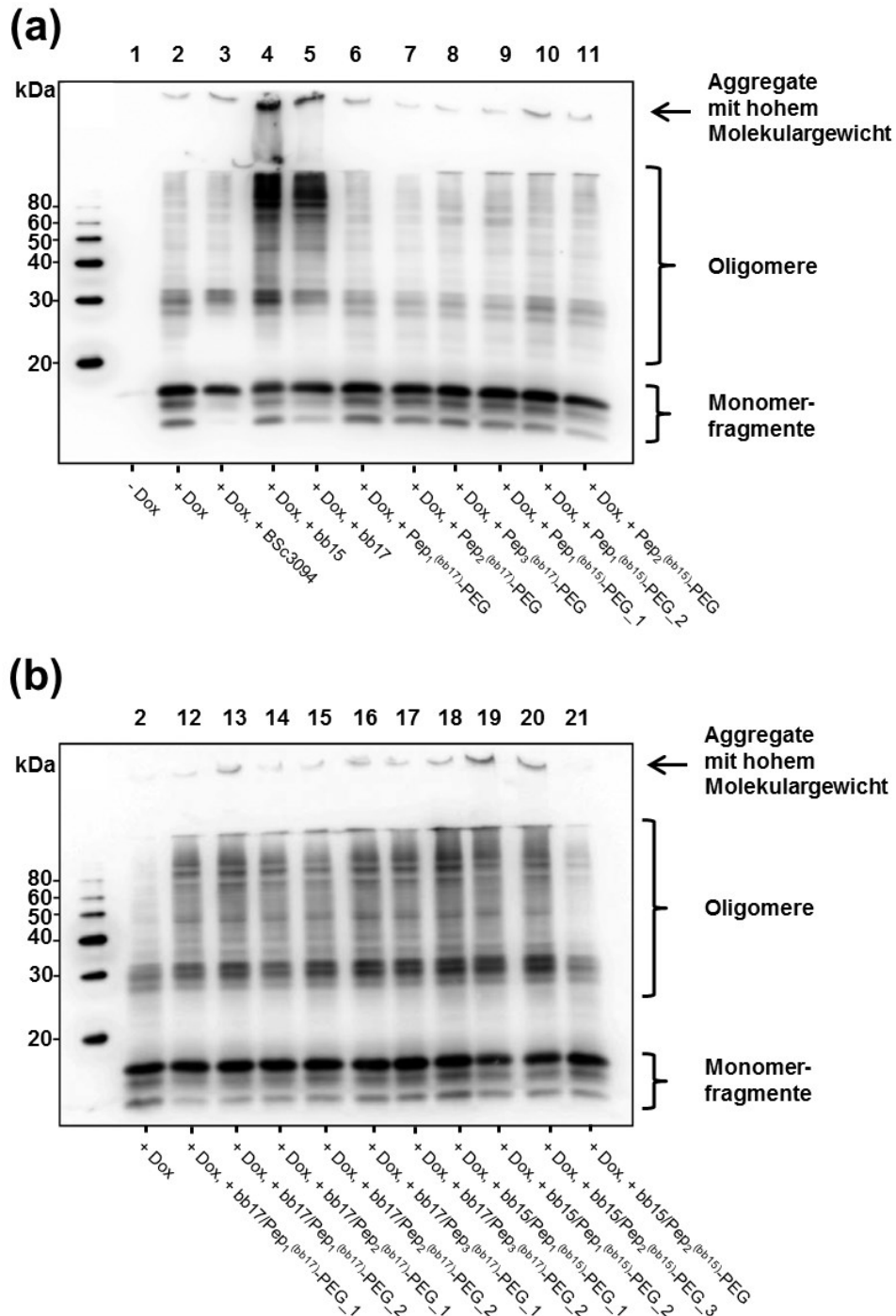
Tau-Protein-Aggregation in den Zellen ermittelt wurde. Das störende Fluoreszenz-Signal wurde exemplarisch für die Inkubation der N2a-Zellen mit bb17 und die Komplexe bb17/Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG dargestellt (**Abb. 59d-f**). Im Gegensatz dazu zeigten induzierte, wirkstoffunbehandelte Messungen kein Fluoreszenz-Signal im FITC-Kanal (**Abb. 59a**). Auch die reinen Konjugate Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG lösten keine Fluoreszenz der Zellen aus (**Abb. 59b,c**). Somit konnte eindeutig dargestellt werden, dass das ThS-überlagernde Fluoreszenz-Signal durch die Inkubation der Zellen mit den Wirkstoffen bb17, bb15 oder den zugehörigen Komplexen ausgelöst wurde.<sup>[164]</sup>



**Abb. 59.** Repräsentative Darstellung der FACS-Messungen Tau-exprimierender N2a-Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen bb17-Systemen. (a-c) Induzierte, wirkstoffunbehandelte Proben und mit den Konjugaten Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG inkubierte Zellen konnten unter Verwendung des FITC-Kanals vermessen werden. (d-f) Der Einsatz von bb17 und den Komplexen bb17/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG führte zu einem starken Fluoreszenz-Signal der gesamten Zellpopulation. Das machte die Quantifizierung ThS-positiver Zellen durch FACS unmöglich. (Bedingungen: Anregungswellenlänge = 495 nm, Emissionswellenlänge = 519 nm).<sup>[164]</sup>

Um die Wirkung der bb17- bzw. bb15-Systeme auf die Tau-Protein-Aggregation bewerten zu können, wurden die inkubierten N2a-Zellen gesammelt und lysiert. Durch PAGE und Westernblot wurden die verschiedenen Tau-Spezies mit und ohne Wirkstoffinkubation analysiert (**Abb. 60**). Nach der Versetzung mit dem pan-Tau-Antikörper K9JA, der spezifisch an Tau bindet, konnten alle monomeren, oligomeren und höher aggregierten Tau-Spezies bei der Tau-induzierten Referenzmessung visualisiert werden (**Abb. 60, Spalte 2**). Weder die Inkubation mit den Wirkstoffen bb17 und bb15 allein (**Abb. 60, Spalten 4 und 5**), noch mit den Konjugaten (**Abb. 60, Spalten 6-11**), noch mit den Komplexen bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG (**Abb. 60, Spalten 12-21**) verringerte den Gesamtanteil an aggregiertem Tau-Protein.<sup>[164]</sup>



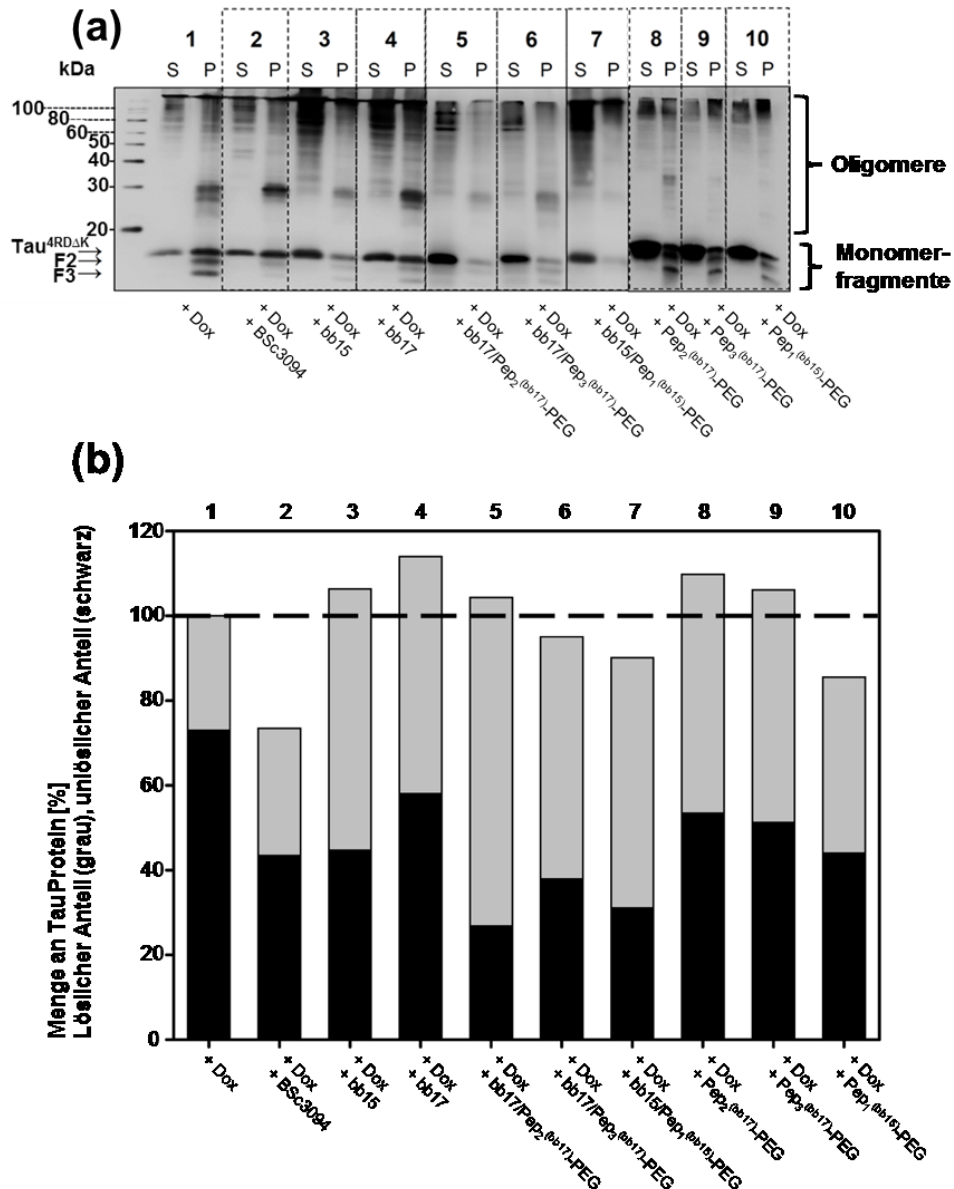


**Abb. 60.** Western-Blot der N2aTau<sup>4RD</sup> ΔK280-Zelllysate im Anschluss an PAGE zur Analyse des Gesamt-Tau-Gehalts der Proben. Tau wurde durch den pan-Tau-Antikörper K9JA visualisiert. Die Referenzmessung der wirkstoffunbehandelten Probe zeigte die typische Verteilung der monomeren, oligomeren und höheraggregierten Tau-Spezies nach der Exprimierung durch Dox (Spalte 2). Alle hier aufgeführten Referenzmessungen verringerten den Gesamtanteil an aggregiertem Tau-Protein nicht. Es erfolgten Untersuchungen (a) von den potentiellen Wirkstoffen BSc3094, bb17, bb15, sowie den Konjugaten Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und (b) von den Komplexen bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG. (Bedingungen: [BSC3094, bb17; bb15; bb17/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG; bb15/Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG; Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG; Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG] = 15 μM, [Dox] = 1 μg/mL, SDS-PAGE: 17%, 100 V, 2 h, Raumtemperatur).<sup>[164]</sup>

Desweiteren wurde ein Pelletierungstest durchgeführt. Möglicherweise könnte die Inkubation der Tau-exprimierenden N2a-Zellen mit bb17- bzw. bb15-Systemen Auswirkungen auf das Verhältnis der löslichen und unlöslichen Tau-Aggregate haben. Dazu wurden die Zelllysate zentrifugiert und Überstand (S) und Pellet (P) einzeln untersucht. Für die Analyse der Fraktionen wurden die Techniken des PAGEs und Westernblots eingesetzt und Tau-Protein-Aggregate wurden durch den pan-Tau-Antikörper K9JA visualisiert (**Abb. 61**). In den N2a-Zelltests wurden die potentiellen Wirkstoffe BSc3094, bb17, bb15, die Komplexe bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, bb17/Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG eingesetzt. Die Expressierung des Tau-Proteins Tau<sup>4RDΔK280</sup> wurde durch die Zugabe von Dox gesteuert.

Die wirkstoffunbehandelte Referenzprobe wies im löslichen Überstand hauptsächlich monomeres und höher aggregiertes Tau-Protein auf, während im Pellet alle Arten von Monomeren (< 20 kDa), niedrigen und höher aggregierten Tau-Oligomeren (> 20 kDa) auftraten (**Abb. 61a,b Spalte 1**). Als positive Kontrollprobe wurde der Wirkstoff BSc3094 eingesetzt (**vgl. Kapitel 2.1.5.**)<sup>[70]</sup> Diese Substanz führte wie für einen Aggregationsinhibitor gewünscht zu einer Reduzierung der oligomeren und aggregierten Tau-Spezies (**Abb. 61a,b Spalte 2**). Der Effekt trat in der hier vorliegenden Versuchsreihe etwas schwach auf, da nur eine geringe BSc3094-Konzentration von 15 µM eingesetzt wurde.

Während die Konjugate allein (**Abb. 61a,b Spalten 8-10**) keinen Einfluss auf die Tau-Protein-Aggregation zeigten, trat durch die Inkubation mit bb17, bb15 oder den Komplexen bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, bb17/Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG eine deutliche Veränderung auf. Obwohl die Gesamtmenge an Tau-Protein nicht verringert wurde, wurden höher aggregierte, unlösliche Tau-Oligomere (> 100 kDa) in lösliche Formen überführt. Dieser Effekt trat bei den Komplexen noch wesentlich stärker als bei bb17 und bb15 (bis zu 28%) auf. Am deutlichsten war die Umwandlung mit bis zu 46% für bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG. Zudem schienen die löslichen Oligomere einen geringeren toxischen Effekt auf die Zellen als die unlöslichen zu haben, da die Zellviabilität durch Inkubation mit den hier aufgeführten Komplexen deutlich verbessert wurde (**vgl Kapitel 3.4.4., Abb. 58**). Die Umwandlung von unlöslichen zu löslichen Protein-Aggregaten könnte zudem Reinigungsprozesse im Zytosol begünstigen, z. B. durch proteasomalen Peptidabbau oder Exocytose.<sup>[153, 164]</sup>



**Abb. 61.** (a) Pelletierungstest der inkubierten, Tau exprimierenden N2a-Zellen. Getestet wurden die potentiellen Wirkstoffe BSc3094, bb17, bb15, die Komplexe bb17/Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG, sowie die Konjugate Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG. Die Unterteilung der zentrifugierten Lysate erfolgte in Überstand S und Pellet P, die Detektion der Tau-Spezies mittels pan-Tau-Antikörper K9JA. Eine wirkstoffunbehandelte Probe (Spalte 1) zeigte das typische Verteilungsmuster an monomeren, bzw. niedrigen und höher aggregierten Tau-Spezies. Eine Inkubation mit BSc3094 reduzierte aggregierte und oligomere Tau-Spezies wie gewünscht (Spalte 2). Der Einsatz von bb17, bb15 und den Komplexen bb17/Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG (Spalten 3-7) führte zu einer Umwandlung unlöslicher in lösliche Aggregate. Die Konjugate Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG hatten keinen Einfluss auf die Tau-Protein-Aggregation (Spalten 8-10). (b) Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Analyse der Überstände (graue Balken) und Pellets (schwarze Balken) von (a). Die Höhe jeweils beider Balken zusammen reflektiert die Menge an Gesamtprotein im Zelllysate (löslicher und unlöslicher Teil) und wurde für die wirkstoffunbehandelte Kontrollmessung (Spalte 1, gestrichelte Linie) auf 100% gesetzt. (Bedingungen: [BSc3094, bb17; bb15; bb17/Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG; bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG; Pep<sub>2-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG; Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG] = 15 µM, [Dox] = 1 µg/mL, Zentrifugation: 50 000 rpm, 1 h, 4°C, SDS-PAGE: 17%, 100 V, 2 h, Raumtemperatur).<sup>[153]</sup>

Somit zeigten die Rhodanin-Konjugat-Komplexe sowohl in den zellfreien als auch N2a-Zelltests beträchtliche inhibitorische Effekte hinsichtlich der Tau-Protein-Aggregation. Sehr niedrige IC<sub>50</sub>-Werte in den zellfreien ThS-Biotests bewiesen die optimale Freisetzung der Wirkstoffmoleküle aus den Komplexsystemen in Gegenwart des Tau-Proteins. Der Einsatz der maßgeschneiderten Systeme für die Inhibition der Tau-Protein-Aggregation in N2a-Zellen ergab eine Umwandlung unlöslicher Tau-Aggregate in lösliche Formen. Dadurch konnte die Zellviabilität entscheidend verbessert werden. Zusammenfassend sind diese Ergebnisse in **Abb. 62** dargestellt.

#### Übersicht der zellfreien Biotests der bb17- und bb15-Systeme

Inhibitionsbiotest Dosis-Wirkungs-Experiment Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte					
System	Komponente	Wirkung	System	Komponente	Wirkung
Wirkstoff	bb17	✓	Wirkstoff	bb15	✓
bb17-Komplexe	bb17/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✓	bb15-Komplexe	bb17/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✓
	bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✓		bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	(✓)
	bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✓	bb15-Konjugate	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	✗
bb17-Konjugate	Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✗		Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	✗
	Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✗			

#### Übersicht der N2a-Zelltests bb17- und bb15-Systeme

Toxizitätsuntersuchungen, Steigerung der Zellviabilität			Inhibition der Tau-Protein-Aggregation in N2a-Zellen		
System	Komponente	Geringe Toxizität	System	Komponente	Wirkung
Wirkstoff	bb17, bb15	✓	Wirkstoff	bb17, bb15	Überführung unlöslicher Aggregate in lösliche Formen
bb17-Komplexe	bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✓	bb17-Komplexe	bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	Überführung unlöslicher Aggregate in lösliche Formen
	bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✓		bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	Überführung unlöslicher Aggregate in lösliche Formen
bb15-Komplexe	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	✓	bb17-Konjugate	Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✗
				Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	✗
			bb15-Komplex	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	Überführung unlöslicher Aggregate in lösliche Formen
			bb15-Konjugat	Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	✗

**Abb. 62.** Zusammenfassung der zellfreien Biotests und N2a-Zelltests für bb17- und bb15-Systeme.

Verglichen mit den N2a-Zelltests der B4A1-Systeme schienen die Rhodanine und Rhodanin-Komplexe besser durch die Zellmembranen zu gelangen und dementsprechend einen weitaus größeren Effekt auf die Tau-Protein-Aggregation zu haben.

Möglicherweise spielten hierbei die Polaritäten der Wirkstoffe und der affinen Peptidsequenzen eine große Rolle, da die B4A1-affinen Peptide stark basischer Natur waren und die Rhodanin-affinen Peptide eher ungeladene Sequenzen aufwiesen. Diese Unterschiede könnten bewirken, dass die B4A1-Komplexe sehr dynamische Systeme darstellten, während die Rhodanin-Komplexe definiertere und starrere Kolloide ausbildeten. Für den Transport der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in die Zellen könnte dieser Umstand zu unterschiedlichen Effektivitäten hinsichtlich der Zellpenetration führen. So wäre es z. B. denkbar, dass bei einem endozytotischen Aufnahmemechanismus die Erkennung der B4A1-Komplexe aufgrund der hohen Dynamik problematischer ablaufen würde als für die Rhodanin-Komplexe, da die Positionen der Moleküle im B4A1-Komplex sehr schnell zu wechseln schienen und für die Rezeptoren passende Liganden seltener erkannt werden könnten.<sup>[169]</sup> Zudem könnte die Größe der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Zellpenetration spielen. Da die im Vergleich zu den B4A1-Komplexen kleineren Rodanin-Komplexe deutlich höhere inhibitorische Aktivitäten in den N2a-Zelltests aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass kleinere Komplexe die Zellmembranen leichter überqueren können.

## 4. Zusammenfassung

Eines der bedeutendsten Probleme der Pharmaindustrie und der pharmazeutischen Chemie ist die schlechte Wasserlöslichkeit vieler Wirkstoffkandidaten. Fast 90% aller entworfenen aktiven Moleküle in der Entwicklungsphase sind schlecht wasserlöslich.<sup>[87]</sup> In der vorliegenden Arbeit waren potentielle anti-AD-Wirkstoffe, die die Aggregation des Tau-Proteins inhibieren und bereits gebildete Aggregate deaggregieren können, Gegenstand der Untersuchungen.<sup>[2]</sup> Diese gehören der Klasse der Rhodanine (bb14, bb17 und bb15) und der *N*-Phenylamine (B4A1) an und konnten bisher aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit in Biotests nur unter Zusatz von DMSO eingesetzt werden.

Zur gezielten Solubilisierung der potentiellen Wirkstoffe wurde der Ansatz der maßgeschneiderten Peptid-PEG-Konjugate genutzt. Während der Wirkstoff nicht-kovalent über das kombinatorisch ausgewählte Peptidsegment gebunden wurde, vermittelte der PEG-Block die Wasserlöslichkeit des entstehenden Wirkstoff-Konjugat-Komplexes.<sup>[13a]</sup> Das Konzept ermöglicht den schnellen Zugang zu maßgeschneiderten Formulierungsadditiven mithilfe einer etablierten Screeningprozedur, wobei Strukturen und Aktivitäten der Wirkstoffe durch Anwendung der Methode nicht verändert werden. Die Bioverfügbarkeiten von Wirkstoffkandidaten können deutlich erhöht und deren Bioaktivität im frühen Stadium ohne Zusatz organischer Lösungsmittel untersucht werden. Auch die Einstellung verschiedener Parameter, die für eine effektive Wirkstoffverabreichung von Bedeutung sind, ist möglich. So können über die Vervielfältigung der Peptidsequenzen oder über Variationen der PEG-Block-Länge z. B. die Wirkstoffkapazitäten der Konjugate oder die Größen der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe angepasst werden.<sup>[146]</sup> Auch die Feinjustierung der Wirkstofffreisetzung in Anwesenheit des Zielmoleküls kann durch die Wirkstoffsolubilisierung mit Peptid-PEG-Konjugaten erfolgen. Das ist mit herkömmlichen Formulierungsadditiven wie Pluronic<sup>®</sup>, das Wirkstoffe über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen bindet, nur erschwert möglich.<sup>[170]</sup> So konnte z. B. gezeigt werden, dass der Wirkstoff *m*-THPC aus einem Wirkstoff-Konjugat-Komplex wesentlich schneller als aus einem Wirkstoff-Pluronic<sup>®</sup>-Komplex in Gegenwart des Zielmoleküls freigesetzt werden konnte.<sup>[13a, 146]</sup> Verzögerungen in der Wirkstofffreisetzung sind generell problematisch, da sie zu erheblichen Nebenwirkungen bei medikamentösen Behandlungen führen können.<sup>[171]</sup>

Desweiteren sind Peptid-PEG-Konjugate weniger starr amphiphil als Pluronic<sup>®</sup>, das lediglich aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Teil zusammengesetzt ist. Die Konjugate stellen weiche Materialien dar, da der peptidische Anteil nicht nur hydrophobe Eigenschaften aufweist, sondern über polare Seitenketten oder das peptidische Rückgrat auch Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Ein genereller Vorteil weicher Materialien im Gegensatz zu herkömmlichen Stoffen ist, dass diese eine hohe Flexibilität aufweisen und dennoch sehr stabil sind.<sup>[172]</sup> So könnten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe möglicherweise eine höhere Stabilität in Anwendungen zeigen als z. B. durch Pluronic<sup>®</sup> gebundene Wirkstoffe, da Pluronic<sup>®</sup> bei *in vivo* Studien schnell biologisch abgebaut werden kann.<sup>[173]</sup>

Die Strategie der spezifischen Wirkstoffsolubilisierung durch Peptid-PEG-Konjugate beinhaltet die Synthese kombinatorischer Peptidbibliotheken aus Bausteinen mit adäquaten Funktionalitäten für Wechselwirkungen mit den Wirkstoffen und die Inkubationen der Bibliotheken mit den aktiven Substanzen. Die bisher genutzte Fluoreszenz-Mikroskopie-

basierte Methode zur Identifikation von Bibliothekspartikeln mit hoher Wirkstoffanreicherung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf nicht-fluoreszente Substanzklassen erweitert, sodass der Raum der möglichen Substanzkandidaten stark vergrößert wurde. Hierfür wurde eine Raman-mikroskopiebasierte Methode etabliert. Zudem konnte die Raman-Messung für die Identifizierung positiver Treffer von einem zunächst hochaufgelösten, zeitaufwändigen Raman-Scan automatisiert werden, sodass die schnelle Messung einer Vielzahl von Bibliotheksträgern möglich wurde. Insgesamt wurden Screeningprozeduren für zwei Raman-aktive und zwei fluoreszenzaktive potentielle Wirkstoffe durchgeführt. Bibliotheksträger mit hoher Wirkstoffanreicherung wurden isoliert, die Peptide von den Harzträgern abgespalten und mittels MALDI-MS/MS sequenziert.

Wirkstoff-affine Peptidsequenzen wurden für jeden der verschiedenen Wirkstoffe als Peptid-Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate synthetisiert und in einer forcierten Beladungsprozedur in wasserlösliche Wirkstoff-Konjugat-Komplexe überführt. Für die *N*-Phenylamin- und Rhodanin-Komplexe konnten Wirkstoff:Transporter-Verhältnisse von nahezu stöchiometrischen Verhältnissen von 1:1.1 bis zu guten Verhältnissen von 1:22.2 erhalten werden. DLS-Messungen zur Größenermittlung der Komplexe in wässriger Lösung ergänzten die erhaltenen Erkenntnisse. Mit einem  $R_h$  von 49-71 nm fielen die Rhodanin-Komplexe deutlich kleiner als die B4A1-Komplexe mit  $R_h = 105-175$  nm aus und eignen sich mit dieser Größe gut für biomedizinische Anwendungen.<sup>[4]</sup> Die unterschiedlichen Größenverhältnisse der Komplexe könnten sich aufgrund der höheren Hydrophobie der Rhodanine verglichen mit dem *N*-Phenylamin ergeben.

Für die *N*-Phenylamin-Komplexe wurden zusätzlich Molekulardynamik (MD)-Simulationen idealisierter 1:1-Komplexe (B4A1:Peptid) durchgeführt. Auf diesem Weg konnte ein besseres Verständnis für die Art der Wirkstoffbindung durch das maßgeschneiderte Peptid gewonnen werden. Vor allem  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen traten in den Modell-Komplexen auf und zeigten den Beitrag der Seitenketten-Funktionalitäten in Abhängigkeit ihrer Position im Peptid auf. Auch das peptidische Rückgrat spielte eine wichtige Rolle für die Solubilisierung des Wirkstoffs.

Weiterhin wurde der Einfluss der PEG-Länge auf die Kapazität eines B4A1-affinen Konjugats systematisch untersucht. Die höchste Solubilisatorkapazität und gleichzeitig die geringste und damit kostengünstigste PEG-Länge wurden durch das herkömmlich genutzte Konjugat PEG<sub>3,2k</sub> erreicht. Mit dieser Konjugatlänge wurden auch exemplarisch für zwei *N*-Phenylamin-Konjugate Alanin- und Serinscans durchgeführt, die die Sequenz-Spezifität des Solubilisator-Konzepts unterstreichen konnten. Eine Erweiterung zweier *N*-Phenylamin-Konjugate und zweier Rhodanin-Konjugate durch Palmitinsäure ergab unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Wirkstoffkapazität der Konjugate. Während sich die Solubilisator-Kapazität für die *N*-Phenylamin-Komplexen verringerte, ergaben sich für die Rhodanin-Komplexe deutliche Verbesserungen der molaren Wirkstoff-Solubilisator-Verhältnisse. Die Größen aller getesteten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe nahmen durch die Modifikation der Konjugate mit Palmitinsäure ab. So konnten kleinere, stabilere Aggregate im Vergleich zu den herkömmlichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexen dargestellt werden.

Die vielversprechendsten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe wurden in Biotests der Tau-Protein-Aggregation eingesetzt. In zellfreien Bioassays konnten die *N*-Phenylamin-Konjugate sowohl die Tau-Protein-Aggregation inhibieren als auch bereits gebildete Tau-Protein-Aggregate in

vergleichbarer Aktivität mit dem Wirkstoff unter Zusatz von DMSO wieder lösen. Die Komplexe bb17/Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, bb17/Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG, bb17/Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und bb15/Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG zeigten ebenfalls gute inhibitorische Aktivitäten in Tau-basierten Biotests. Drei der Komplexe bewährten sich zudem in Tau<sup>4RΔK</sup>-exprimierenden N2a-Zellen. Die Zelllebensfähigkeit wurde verbessert und zudem konnten unlösliche Tau-Aggregate in lösliche Formen überführt werden.

Der vorgestellte DMSO-freie Ansatz der Inhibition der Tau-Protein-Aggregation stellt prinzipiell eine sehr gute Alternative zu den ursprünglichen Biotests unter Zusatz von DMSO dar.<sup>[66]</sup> Mögliche Risiken der Proteinveränderung durch DMSO in Biotests könnten durch diesen Ansatz verhindert werden.<sup>[3]</sup> Außerdem unterliegen Zelltests unter Zusatz von DMSO Limitierungen hinsichtlich der Wirkstoffkonzentration, da Zellen nur einen bestimmten Gehalt an DMSO tolerieren. So zeigten sich für verschiedene Zelltypen bereits toxische Effekte von DMSO bei Konzentrationen < 1%.<sup>[174]</sup> Die in der vorliegenden Arbeit genutzten N2a-Zelltests wurden für verschiedene Wirkstoffklassen mit Wirkstoffkonzentrationen von 15 µM aufgrund der DMSO-Einschränkungen durchgeführt.<sup>[1a, 35]</sup> Mit wasserlöslichen Wirkstoff-Konjugat-Komplexen wären in Abhängigkeit vom Wirkstoff:Konjugat-Verhältnis durchaus höhere Wirkstoffkonzentrationen in den Tests möglich als für die Wirkstoffe allein unter Zusatz von DMSO.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, wie eine interessante Klasse von Wirkstoffsolubilisatoren die anti-Alzheimer-Wirkstoffe nicht nur effektiv in der wässrigen Phase binden, sondern in Gegenwart des Tau-Proteins auch wieder freisetzen konnte. Die Wirkstoffe entfalteten auf diesem Weg eine effektive Wirkung hinsichtlich der Tau-Protein-Aggregation, wobei die Solubilisatoren nur einen geringen Einfluss auf die Wirkstoffaktivitäten hatten.



## 5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit ermöglichte die Erweiterung des Konzepts der Wirkstoffsolubilisierung durch Peptid-PEG-Konjugate. Während vorangehende Forschungen die Untersuchung fluoreszenter Wirkstoffe gewährleisteten<sup>[170]</sup>, konnten im Rahmen der vorgestellten Ergebnisse am Beispiel von anti-AD-Wirkstoffen auch Raman-aktive Substanzen untersucht und Konjugate mit hoher Wirkstoffkapazität synthetisiert werden. Von Interesse wäre nun der Entwurf einer Screeningprozedur, die zusätzlich zur Identifikation wirkstoffaffiner Peptidsequenzen auch die Freisetzung der Wirkstoffe aus den resultierenden Wirkstoff-Konjugat-Komplexen berücksichtigt. So wäre eine Feineinstellung der gezielten Wirkstoffabgabe durch Variation der Peptidsequenzen möglich. Ein derartiges zweidimensionales Wirkstoffscreening könnte zunächst die Inkubation von immobilisierten Peptidbibliotheken mit schlecht wasserlöslichen Wirkstoffen und die Identifikation von wirkstoffaffinen Peptidsequenzen mithilfe analytischer Methoden vorsehen. Anschließend wäre ein Waschschriff mit z. B. plasmaähnlichen Proteinlösungen sinnvoll. Auf diese Art wäre es wahrscheinlich möglich zu beobachten, welche der zuvor als stark wirkstoffaffin identifizierten Peptidsequenzen die Wirkstoffe in einer blutähnlichen Umgebung effektiv freisetzen, bzw. zurückhalten könnten, in Abhängigkeit der Zielanwendung des Wirkstoffs.

Außerdem könnte der Einsatz der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in Biotests der Tau-Protein-Aggregation durch die Einführung von zellpenetrierenden Peptiden (Cell-Penetrating Peptides, CPPs) optimiert werden. In die Konjugate eingefügte CPPs könnten die Zellpenetration der anti-AD-Wirkstoffe in Biotests vermutlich noch steigern. Leicht zu synthetisierende CPPs wie TAT<sup>[175]</sup> oder Polyarginine<sup>[176]</sup> könnten zunächst durch gängige Festphasen- und Kupplungschemie in die Konjugatsynthese eingebunden werden. Da CPPs am *N*-Terminus die größte zellpenetrierende Wirkung entfalten können, könnte die Synthese der wirkstoffbindenden Peptidsequenz zunächst am Harz mit anschließender Kupplung eines funktionalisierten PEGs erfolgen.<sup>[177]</sup> Nach der Abspaltung des inversen Konjugats von der Festphase wäre die Kupplung mit dem jeweiligen CPP in Lösung denkbar.

Obwohl die Kosten, die für Peptidsynthesen anfallen, innerhalb der letzten Jahrzehnte optimiert wurden, sind Synthesen im großen Maßstab dennoch aufgrund der hohen Materialkosten der eingesetzten Aminosäuren und Kupplungsreagenzien untragbar. Vor allem der Umstand, dass Aminosäuren in der Peptid-Kupplungschemie für eine effektive Kupplung meist im Überschuss eingesetzt werden, führt zu erheblichen Unkosten.<sup>[178]</sup> Daher wäre es wünschenswert, die dargelegten Ergebnisse der Wirkstoffsolubilisierung durch Peptid-PEG-Konjugate auf Solubilisatoren rein polymerer Natur zu übertragen. Im Rahmen dieser Überlegung sollten sich die Funktionalitäten der Peptide, die sich als wirkungsvoll für die Bindung der anti-AD-Wirkstoffe erwiesen haben, in den polymeren Solubilisatoren wiederfinden. Diese Strategie der Übersetzung der peptidischen Eigenschaften auf Polymere als spezifische Formulationsadditive könnte in der Materialwissenschaft vielseitig eingesetzt werden. Sie würde eine kostengünstige Alternative zu den vorgestellten Peptid-PEG-Konjugaten darstellen, da die Herstellung von Polymeren im großen Maßstab weitaus preiswerter als die Herstellung von Peptiden ist.<sup>[179]</sup>

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Materialien

**Tab. 11.** Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien und Angaben der Anbieter, bzw. Hersteller dieser Substanzen.

Materialien, Chemikalien	Anbieter, Hersteller
Acetanhydrid, $\geq 99\%$	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Acetonitril, 99.9%, LC-MS grade	VWR International (Darmstadt, GER)
Ameisensäure, <i>Fluka</i> <sup>®</sup> , für MS, $\sim 98\%$	Sigma Aldrich
Aminomethyl- <i>Chemmatrix</i> <sup>®</sup> -Harz Beladung: 1.0 mmol/g	Sigma Aldrich
Aminosäuren Fmoc-AA-OH	Novabiochem <sup>®</sup> (Darmstadt, GER), IRIS Biotech GmbH (Markredwitz, GER)
B4A1	synthetisiert von B. Bulic (DZNE, Bonn, GER)
bb14, bb17, bb15	synthetisiert von B. Bulic <sup>[1a]</sup> (DZNE, Bonn, GER)
CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , peptide grade, über CaH <sub>2</sub> getrocknet, destilliert	IRIS Biotech GmbH (Markredwitz, GER)
Cremophor ELP	Sigma Aldrich
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure	Sigma Aldrich
DIPEA, peptide grade, destilliert	Acros Organics ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Geel, Belgien)
DMSO, 99 <sup>+</sup> %	Alfa Aesar (Kandel, GER)
HBTU	IRIS Biotech GmbH (Markredwitz, GER)

Fmoc-Rinkamid AM Polystyrol-Harz Beladung: 0.59 mmol/g*	IRIS Biotech GmbH (Markredwitz, GER)
Guanidinium hydrochlorid, $\geq 99.5\%$	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
Methanol, LC-MS grade	Acros Organics ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Geel, Belgien)
NMP, 99.9 <sup>+</sup> %, peptide grade, filtriert	IRIS Biotech GmbH (Markredwitz, GER)
PEG <sub>2000</sub> , M = 1800-2200 g/mol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
Piperidin, peptide grade, über KOH getrocknet, destilliert	Acros Organics ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Geel, Belgien)
PyBOP	IRIS Biotech GmbH (Markredwitz, GER)
TentaGel <sup>®</sup> -PAP-Harze Beladung: 0.23 mmol für M <sub>n</sub> = 3.2 kDa Beladung: 0.17 mmol für M <sub>n</sub> = 5.2 kDa Beladung: 0.23 mmol für M <sub>n</sub> = 1.4 kDa Beladung: 0.23 mmol für M <sub>n</sub> = 0.85 kDa	Rapp Polymere (Tübingen, GER)
TES, 98 <sup>+</sup> %	Alfa Aesar (Karlsruhe, GER)
TFA, peptide grade, destilliert	Acros Organics ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Geel, Belgien)
TFA-d, 99.5 atom% D	Acros Organics ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Geel, Belgien)
Wasser	Wasser aus einer Merck Millipore Milli- Q <sup>®</sup> Reinstwasseranlage (Darmstadt, GER)

\* Die Beladung des Harzes wurde vor der Peptidsynthese auf 0.25 mmol reduziert. Dies gelang unter Verwendung der entsprechenden *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäure.

## 6.2. Geräte

**Automatisierte, festphasengebundene Peptidsynthese:** Alle Peptid-Polymer-Konjugate wurden durch die inverse Konjugationsstrategie an ABI 433a Peptidsynthesizern (Applied Biosystems, Darmstadt, GER) durch automatisierte, festphasengebundene Peptidsynthese

(0.1 mmol) dargestellt. Wie kürzlich berichtet wurden Standard *ABI-Fastmoc*-Protokolle (single couple) und das Lösungsmittel NMP verwendet.<sup>[180]</sup>

**Konfokale Raman-Mikroskopie:** Alle Raman-Spektren wurden mit einem konfokalen *alpha300* Raman-Mikroskop (WITEC, Ulm, GER) aufgenommen. Das Mikroskop war mit Objektiven mit 10-, 20-, 50- und 100-facher Vergrößerung und Lasern mit den Wellenlängen 532 nm, 633 nm und 785 nm ausgestattet. Für die Messungen wurde der 785 nm Laser bei einer Leistung von 96, bzw. 74 mW hinter dem Objektiv genutzt.

**MALDI-ToF-MS-Spektrometrie:** Die Peptid-Polymer-Konjugate wurden durch MALDI-ToF-MS mit einem *Autoflex III Smartbeam-System* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, GER) charakterisiert, das mit einem Smartbeam Laser (355 nm, 200 Hz Arbeitsfrequenz) ausgestattet war. Die Detektion der Signale erfolgte mithilfe eines Time-of-Flight-Detektors unter einer Spannung von 24 kV. Die Spektren wurden mit der Software *FlexControl 1.3* ausgewertet.

**MALDI-ToF-MS/MS-Spektrometrie:** Mithilfe eines *5800 MALDI ToF/ToF Systems* (AB SCIEX, Framingham, MA, USA), das mit einem Neodym-dotierten Yttrium-Lithium (Nd:YFI) Laser ausgestattet war, konnten die Peptidsequenzen der positiven Treffer identifiziert werden. Je 1 µL der Peptid-Abspaltungslösung wurde auf eine MALDI-Probenplatte aufgetragen. Nach dem Hinzufügen von 1 µL Matrix-Lösung ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, 5 mg/mL), gelöst in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (0.65:0.35, v/v + 0.3% TFA) wurde die Platte an der Luft getrocknet. Alle MS-Spektren wurden als Durchschnittswerte aus 4000 Laserschüssen im positiven Reflektron-Modus aufgezeichnet. Von den fünf intensivsten Peaks ( $S/N > 20$ ) der Vorläufer-Ionen wurden Fragmentierungs-Spektren als Durchschnitt aus 5000 Laserschüssen aufgenommen. Dabei wurde die Kollisionsenergie (Kollisionsgas: Luft) auf 1 keV und das Massfenster der Vorläufer-Ionen auf eine Halbwertsbreite (engl.: Full Width at Half Maximum, FWHM) von 200 gesetzt. Für die Datenauswertung wurde die Software *GPS Explorer* (Version 3.6, *Applied Biosystems, Life Technologies Corp.*, Carlsbad, CA 92008, USA) genutzt. Dazu wurden die Daten auf einen *MASCOT Server* (Version 2.2, *Matrix Science Ltd.*, London W1U 7GB, UK) übertragen. Mithilfe des Servers erfolgte der Abgleich der Fragmentionen mit einer Datei, die alle theoretisch in der Bibliothek enthaltenen Peptidsequenzen enthielt.

**<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie:** Alle NMR-Spektren wurden mithilfe eines *Bruker AV 500* Spektrometers bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Proben wurden vor der Messung in TFA-d6 gelöst.

**ATR-FT-IR-Spektroskopie:** Alle IR-Spektren wurden an einem Fourier-Transform-Infrarotspektrometer (Golden gate) des Typs Vertex 70v (Bruker Inc., Billerica, MA, USA) aufgenommen.

**UV/Vis-Spektroskopie:** UV/Vis-Absorptionsspektren wurden an einem *Shimadzu UV-2501 PC*-Spektrometer (Shimadzu Corp., 604-8511 Kyoto, Japan) gemessen. Dabei wurden Proben im Vergleich zu einer Referenz in Einweg-Küvetten (1 mL, 10 mm Weg) aufgenommen.

**DLS-Messungen:** Alle DLS-Messungen erfolgten in PMMA-Einwegküvetten an einem Zetasizer System des Typs Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Durch

Anwendung der Software Malvern Nanosizer konnten die hydrodynamischen Radien aus den Korrelationsfunktionen berechnet werden.

**Präparative Flüssigphasenchromatographie (prep-HPLC):** Die Aufreinigung der Peptide erfolgte mit einer prep-HPLC der Firma Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, GER). Das Gerät enthielt einen *CBM-20A*-Controller, einen *DGU-14A*-Online-Entgaser, eine *LC-20AP*-Pumpe, einen *SIL-20AHT*-Autosampler, einen *FRC-10A*-Fraktionssammler und einen dualen *SPD-10Avp* UV/Vis-Detektor (Monitoring bei 210 nm). Die Aufreinigung erfolgte durch eine *Synergy<sup>TM</sup> Fusion-RP*-Säule (80 Å, 4 µm, 250 x 21.20 mm, Phenomenex®, Aschaffenburg, GER) mit vorgeschalteter *SecurityGuard<sup>TM</sup> PREP*-Kartusche (*Fusion-RP* 15 x 21.20 mm, Phenomenex®, Aschaffenburg, GER). Die Proben wurden in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (70%, v/v) gelöst. Als Flussrate wurde eine Geschwindigkeit von 22.0 mL/min bei einer Lösungsmittelmischung aus Wasser/0.1% Ameisensäure (v/v, Lösung A) und Acetonitril/0.1% Ameisensäure (v/v, Lösung B) bei Raumtemperatur gewählt. Mit einem linearen Gradienten von 75-95% B in A über 30 min wurde eine geeignete Aufreinigung der Peptide erreicht.

### 6.3. Screeningprozedur

#### 6.3.1. Synthese der Peptidbibliotheken<sup>[8b, 13a]</sup>

Unter Anwendung der Fmoc-Strategie<sup>[113]</sup> wurde eine Peptidbibliothek für das Screening des Wirkstoffs B4A1 manuell synthetisiert. Die für das Screening der Wirkstoffe bb14, bb17 und bb15 verwendete Bibliothek wurde nach derselben Methode von S. Wieczorek synthetisiert.<sup>[13a]</sup> Als variable Aminosäuren der Bibliotheken wurden Arg, Lys, His, Phe, Asn, Thr und Glu gewählt, während in der für die Screenings von bb14, bb17 und bb15 enthaltenen Bibliothek Phe, Leu, Gln, Ser, Glu, Lys und Gly enthalten waren.

Als Festphase diente das Aminomethyl-*ChemMatrix®*-Harz mit einer Beladung von 1.00 mmol/g im 1.50 mmol Maßstab. Zunächst wurde eine spaltbare Linker-Sequenz (Gly-Gly-Met) an das Harz gekuppelt. Die jeweiligen geschützten Aminosäuren Fmoc-AA-OH (5 Äq., 7.5 mmol) wurden hierzu gemeinsam mit PyBoP (5 Äq., 7.5 mmol) und DIPEA (10 Äq., 15 mmol) in NMP gelöst. Nachdem die Festphase 30 min in NMP vorgequollen war, wurde die aktivierte Aminosäuremischung zum Harz gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde das Harz mehrfach gewaschen (5 x NMP, 5 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 x NMP). Aminofunktionalitäten, die bei der Kupplung nicht umgesetzt wurden, wurden mit Ac<sub>2</sub>O (10%) und DIPEA (10%) in NMP (2 x 10 min) acetyliert und das Harz anschließend erneut gewaschen (5 x NMP, 5 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 x NMP). Die Entschützung der Fmoc-Gruppen erfolgte durch Zugabe von Piperidin (20% in NMP) zum Harz (3 x 10 min). Für alle drei Aminosäuren der Linker-Sequenz wurde dieser Zyklus wiederholt, sodass die Sequenz Gly-Gly-Met an alle Träger der Festphase gekuppelt wurde. Im nächsten Schritt wurde eine variable Heptapeptidsequenz unter Anwendung der *Split-und-Mix-Synthese*<sup>[150]</sup> an die Linker-Sequenz gekuppelt. Als Aminosäure-Derivate wurden hierfür Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH und Fmoc-Glu(tBu)-OH eingesetzt. Um die verschiedenen Peptidsequenzen zu

erhalten, wurde die Festphase in sieben gleichgroße Aliquote in sieben Spritzenreaktoren aufgeteilt. Jedes der Aliquote wurde mit je einer der sieben ausgewählten Aminosäuren (5 Äq., 1.07 mmol), PyBoP (5 Äq., 1.07 mmol) und DIPEA (10 Äq., 2.14 mmol) umgesetzt. Die Reaktionen erfolgten in NMP und bei leichtem Schütteln über Nacht. Anschließend wurden alle Aliquote durchmischt und gewaschen (5 x NMP, 5 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 x NMP). Die Acetylierung nicht umgesetzter Aminofunktionalitäten und die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgten wie oben beschrieben. Insgesamt wurde der Vorgang der *Split-und-Mix-Synthese* sieben Mal wiederholt, sodass eine Peptidbibliothek mit theoretisch 7<sup>7</sup> (~832 000) verschiedenen Peptidsequenzen erhalten werden konnte.

### 6.3.2. Inkubation der Peptidbibliotheken<sup>[8b, 13a, 153]</sup>

Die Wirkstoffe wurden zunächst in einer Mischung aus DMSO (400 µL) und Wasser (500 µL) gelöst. Hierzu wurden je 1 mg B4A1 (2.44 µmol), 1 mg bb14 (2.21 µmol), 1 mg bb17 (2.07 µmol) und 1 mg bb15 (2.03 µmol) eingesetzt. Die Mischungen wurden zu je einer Spatelspitze der Peptidbibliotheken gegeben und diese über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Festphasen in Spritzenreaktoren überführt und mit je 1 mL DMSO gewaschen. Auf diese Weise wurden ungebundene oder nur schwach gebundene Wirkstoffmoleküle von den Bibliotheksträgern entfernt. Die mit B4A1 und bb14 inkubierten Bibliotheken wurden im Folgenden ausgiebig mit Wasser (20 x) gewaschen. Auf diese Weise konnte noch vorhandenes DMSO von den Harzkügelchen entfernt werden, um störende DMSO-Raman-Signale bei den folgenden Messungen zu vermeiden. Die gereinigten Bibliotheken wurden auf einem Glas-Objektträger mit integriertem Koordinatensystem an der Luft getrocknet. Alle Bibliotheksträger, die mit bb17 oder bb15 inkubiert wurden, wurden in mit Wasser gefüllte Petrischalen gegeben und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### 6.3.3. Analyse der inkubierten Peptidbibliotheksträger

B4A1<sup>[8b]</sup>: Für die Aufnahme und Auswertung aller Raman-Messungen wurde die Software *WITEC Project* genutzt. Mithilfe der Methode *Image Stitching* wurden zuerst die Positionen der getrockneten Bibliothekskügelchen durch Aufnahme eines optischen Mikroskopiebildes (5000 x 5000 µm) festgelegt. Die den Kugeln zugehörigen Raman-Spektren wurden automatisch in der Mitte der Kugeln mit der Methode *Auto-Focus-Single-Spectrum* bei einer Wellenlänge von 785 nm und einer Laserleistung von 96 mW (hinter dem Objektiv) aufgenommen. Dabei wurde der Fokus des Raman-Mikroskops automatisch vor jeder einzelnen Messung auf maximale Raman-Signale, eingestellt (*Auto-Focus*). Dadurch konnte die Vergleichbarkeit der Peak-Intensitätshöhen einzelner Raman-Banden gewährleistet werden, obwohl die Bibliotheksträger unterschiedliche Größen aufwiesen. Zur Ausführung der *Auto-Focus*-Funktion wurde für den Wirkstoff B4A1 der Peakbereich 51 – 59 cm<sup>-1</sup> gewählt, innerhalb dessen die Optimierung des Fokusses durchgeführt wurde. In dieser Region trat ein sehr starkes Raman-Signal auf, dass nicht durch Signale des Trägerharzes überlagert wurde. Um den *Auto-Focus* einzustellen, wurde jeweils eine Strecke von 200 µm,

in der der Fokus gesucht wurde, und eine minimale Integrationszeit von 0.1 s gewählt. Auf der Höhe, auf der das Peak-Maximum erreicht wurde, wurde schließlich das der Kugel zugehörige Raman-Spektrum mit 2 s Integrationszeit und zwei Wiederholungen gemessen. Dabei wurde ersichtlich, dass bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  eine für B4A1 spezifische Raman-Bande auftrat. Durch den Intensitätenvergleich dieser Bande für die verschiedenen Harzkugeln konnten Kugeln mit hoher bis geringer Wirkstoffaffinität unterschieden werden. Als Grenze für Kugeln mit hoher Affinität zu B4A1 wurden Träger ausgewählt, deren spezifische Raman-Bande mehr als 1000 CCD counts aufwiesen.

In einem Vergleichsexperiment wurden auch die Raman-Spektren der Monoaminosäuren der Peptidbibliothek, immobilisiert auf dem Aminomethyl-*ChemMatrix*®-Harz, aufgenommen. Auf diesem Weg sollte bestätigt werden, dass das Raman-Signal bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  B4A1-spezifisch ist und nicht durch Aminosäuresignale überlagert wurde. Phe zeigte als einzige Aminosäure einen Peak in dieser Region mit einer Intensität von 238 CCD counts. Da dieser Wert deutlich geringer als die gewählte Grenze von B4A1-affinen Trägern ist, konnte erfolgreich bewiesen werden, dass das Raman-Signal bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  B4A1 zuzuordnen ist.

Der hochaufgelöste Raman-Scan von sechs ausgewählten, inkubierten Bibliotheksträgern wurde mithilfe der Methode *Large-Area-Scan* mit 2 s Integrationszeit durchgeführt. Für die Messung wurden 120 points per line und 90 lines per image gewählt. Abschließend wurde durch Integration der CCD counts von  $1595\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$  mit der Filter Manger Software das optische Bild berechnet.

bb14<sup>[8b]</sup>: Die mit bb14 inkubierten Bibliotheksträger wurden wie für B4A1 beschrieben Raman-mikroskopisch untersucht. So erfolgten die Aufnahmen von Raman-Spektren auf den einzelnen Trägern ebenfalls automatisiert. Erneut wurde der Peakbereich von  $51\text{--}59\text{ cm}^{-1}$  gewählt, da in diesem Abschnitt des Raman-Spektrums von bb14 ein wirkstoffspezifischer Peak auftrat, der nicht von Raman-Signalen des Trägerharzes überlagert wurde. In einer Höhe von  $300\text{ }\mu\text{m}$  und mit einer minimalen Integrationszeit von 0.3 s wurde der *Auto-Focus* für jede Kugel gesucht und in der optimalen Höhe je ein Raman-Spektrum mit 6 s Integrationszeit bei einer Laserleistung von 74 mW (hinter dem Objektiv) aufgenommen. Wirkstoffspezifische Raman-Banden bei  $1508$  und  $1595\text{ cm}^{-1}$  konnten genutzt werden, um Träger mit hoher und geringer Wirkstoffaffinität zu unterscheiden. Die Grenze für stark wirkstoffaffine Träger wurde auf mindestens 940 CCD counts bei  $1508\text{ cm}^{-1}$  und mindestens 1200 CCD counts bei  $1595\text{ cm}^{-1}$  gesetzt.

bb17 und bb15<sup>[13a, 153]</sup>: Die Anreicherung der Wirkstoffe bb17 und bb15 wurde mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops untersucht. bb17 wurde dabei mit einer Wellenlänge von 550 nm angeregt, der Wirkstoff bb15 mit einer Wellenlänge von 470 nm. Die Emission der Messungen erfolgte bei 605 nm, bzw. 525 nm. In beiden Fällen konnten stark fluoreszente, mit Wirkstoff angereicherte Träger deutlich von Trägern unterschieden werden, die mäßige oder keine Anreicherung an bb17 oder bb15 zeigten. Alle stark fluoreszenten Kügelchen wurden als positive Treffer bewertet.

#### **6.3.4. Isolierung wirkstoffaffiner Bibliotheksträger und Vorbereitung für die MALDI-Analyse**<sup>[8b, 13a, 153]</sup>

Unter Verwendung einer 10 µL Eppendorf-Pipette wurden für jeden der vier Wirkstoffe B4A1, bb14, bb17 und bb15 mehrere als positive Treffer identifizierte Träger isoliert. Im Fall von B4A1 entsprach dies 40 Trägern, im Fall der mit den Rhodaninen inkubierten Träger je 30 Trägern. Diese wurden in 0.25 mL PCR-Röhrchen transferiert und mit je 20 µM CNBr in 0.1 M HCl (20 mg/mL) über Nacht und unter leichtem Schütteln versetzt. Die Rückstände wurden anschließend gefriergetrocknet.

Alle mit bb14, bb17 und bb15 inkubierten Bibliotheksträger wurden acetyliert um eine spätere Unterscheidung von Gln und Lys in der Massenanalyse zu gewährleisten. So wurden die Träger mit Aceton (40 µL), Ac<sub>2</sub>O/AcOH (10 µL, 1:1 v/v) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der Zugabe eines Acetonitril/Wassergemischs (20 µL, 1:1 v/v), versetzt mit 0.1% TFA, wurde das vorhandene Aceton mithilfe eines Stroms von Argon entfernt und die Proben gefriergetrocknet.

Die Rückstände aller wirkstoffinkubierten Träger – B4A1, bb14, bb17 und bb15 – wurden abschließend in 10 µL eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (1:1 v/v) + 0.1% TFA für die MALDI-ToF-MS/MS-Analyse gelöst.

#### **6.3.5. Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate und Peptide**<sup>[8b, 13a, 153, 162]</sup>

Auf Grundlage der Ergebnisse der MALDI-ToF-MS/MS-Analyse (vgl. **Kapitel 3.1.4. und 3.1.5.**) wurden die zugehörigen Peptid-Polymer-Konjugate synthetisiert. Unter Verwendung des Standard HBTU/NMP/Piperidin-Protokolls wurden die jeweiligen Aminosäuren an TentaGel<sup>®</sup>-PAP-Harze gekuppelt. Diese Trägermaterialien enthielten ein über einen säurelabilen Benzylether gekuppeltes α-Hydroxy-ω-Amino-funktionalisiertes PEG (5200; 3200; 1383; 850 Da). Nach erfolgter Synthese der Peptide wurden die vollständigen Peptid-Polymer-Konjugate vom Harz abgespalten. Dazu wurden die funktionalisierten Harze in einem Gemisch aus 95% TFA, 4% TES und 1% Wasser (5 mL) 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. In kaltem Diethylether konnten die Konjugate ausgefällt und durch Zentrifugation (20 min, 9000 rpm) in fester Form erhalten werden. Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die Konjugate im Vakuum getrocknet. Zur Aufreinigung und Entfernung restlicher TFA-Reste wurden die Konjugate zunächst in Wasser + 0.1% Guanidiniumhydrochlorid gelöst. Nach einer pH-Einstellung auf pH=7 wurden die Lösungen gegen Reinstwasser dialysiert (regenerierte Celluloseschläuche, 500-1000 Da MWCO) und abschließend gefriergetrocknet.

Die Peptide Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup> und Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup> wurden nach der für die Konjugate beschriebenen Methode synthetisiert. Als Festphase diente hierfür das Rinkamid-Harz und die Aufreinigung erfolgte mithilfe von prep-HPLC.



### 6.3.6. Charakterisierung der Peptid-Polymer-Konjugate<sup>[8b, 153, 162]</sup>

$\Delta m = m/z$  44.03 (EO-Wiederholungseinheit).

$Pep_1^{(B4A1)}$ -PEG (FFHHKKK-PEG<sub>3,2k</sub>)

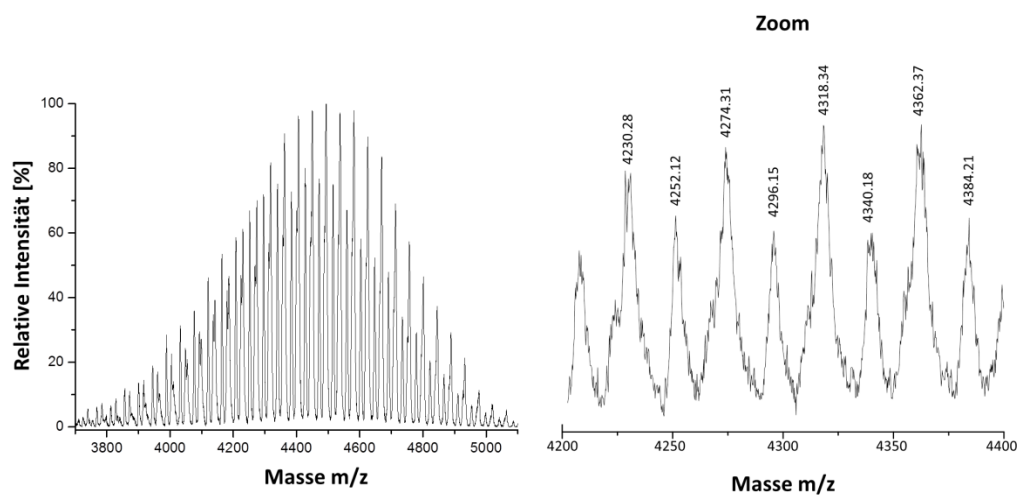


Abb. 63. MALDI-TOF-MS von  $Pep_1^{(B4A1)}$ -PEG.

$$M_{\text{Peak}}[M+H]^+ = m/z \ 4230.28$$

$$M_{\text{ber}}[M+H]^+ = 4229.45 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 4252.12$$

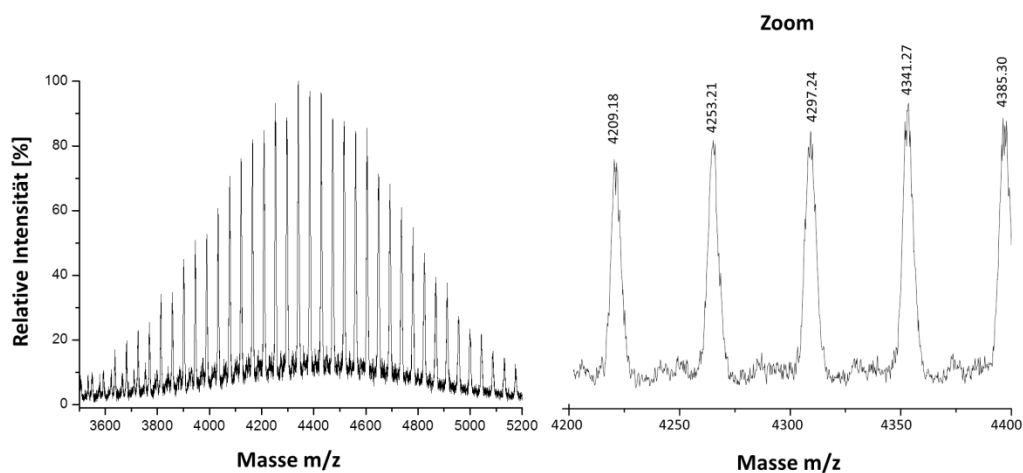
$$M_{\text{ber}}[M+Na]^+ = 4251.43 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{H}} = 4229.45 \text{ Da}.$$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_1$ ,  $\delta$  in ppm): 8.62-8.53 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar, H}}$ ), 7.45-7.35 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar, H}}$ ), 7.34-7.77 (m, 10H,  $\text{CH}_{\text{Ar, F}}$ ), 5.11-5.00 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{F}}$ ), 4.66-4.51 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{K, H}}$ ), 4.03-3.97 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ , PEG), 3.94-3.78 (m, 380H,  $\text{CH}_2$ , PEG), 3.74-3.58 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ , F), 3.27-3.21 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ , L), 1.96-1.81 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ , L), 1.71-1.18 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ , L).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3272 (vw), 3045 (vw), 2884 (vs), 2741 (w), 2320 (w), 2288 (w), 2052 (w), 1987 (w), 1671 (s), 1536 (m), 1466 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (w), 1201 (w), 1144 (m), 1105 (vs), 1065 (m), 958 (m), 840 (m), 795 (w), 721 (w), 629 (vw), 531 (m), 481 (vw).

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (RKHFNTF-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 64.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG.

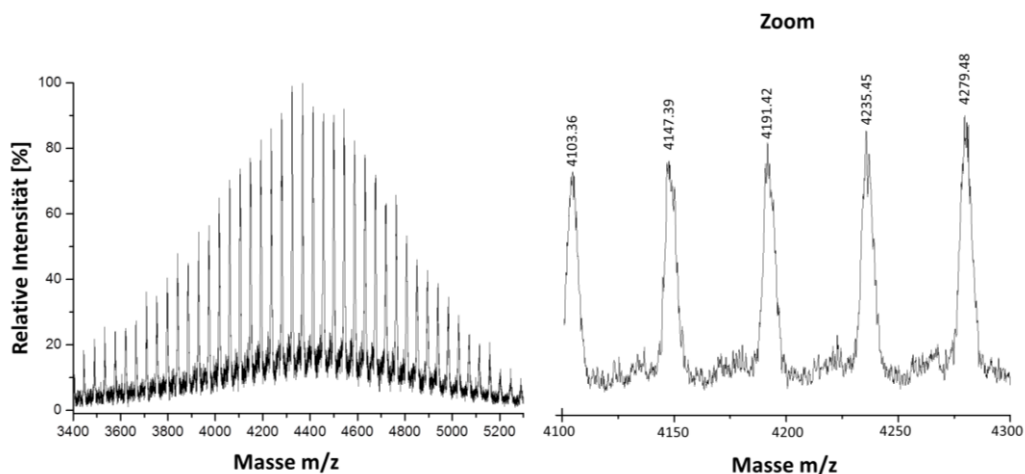
$$M_{\text{Peak}}[M+H]^+ = m/z \ 4209.18$$

$$M_{\text{ber}}[M+H]^+ = 4207.36 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{H}} = 4207.36 \text{ Da.}$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d<sub>1</sub>, δ in ppm): 8.57 (s, 1H, CH<sub>Ar, H</sub>), 7.40 (s, 1H, CH<sub>Ar, H</sub>), 7.33-7.09 (m, 10H, CH<sub>Ar, F</sub>), 5.25-4.99 (m, 2H, CH<sub>F</sub>), 4.93-4.88 (m, 1H, CH<sub>R</sub>), 4.73-4.69 (m, 1H, CH<sub>T</sub>), 4.64-4.53 (m, 4H, CH<sub>T, H, K, N</sub>), 4.06-3.99 (m, 4H, CH<sub>2, PEG</sub>), 3.97-3.79 (m, 324H, CH<sub>2, PEG</sub>), 3.63-2.88 (m, 12H, CH<sub>2, F, K, R, N</sub>), 2.28-2.07 (m, 2H, CH<sub>2, R</sub>), 2.01-1.22 (m, 11H, CH<sub>2, H, K</sub>; CH<sub>3, T</sub>).

FT-IR (ν(cm<sup>-1</sup>)): 3278 (m), 3083 (w), 2883 (vs), 2743 (w), 2323 (vw), 1985 (w), 1668 (m), 1641 (s), 1548 (m), 1466 (m), 1408 (vw), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1099 (vs), 1063 (s), 959 (m), 842 (m), 747 (w), 700 (w), 531 (w).

Pep<sub>3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (FRHKFFN-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 65.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \, 4235.45$$

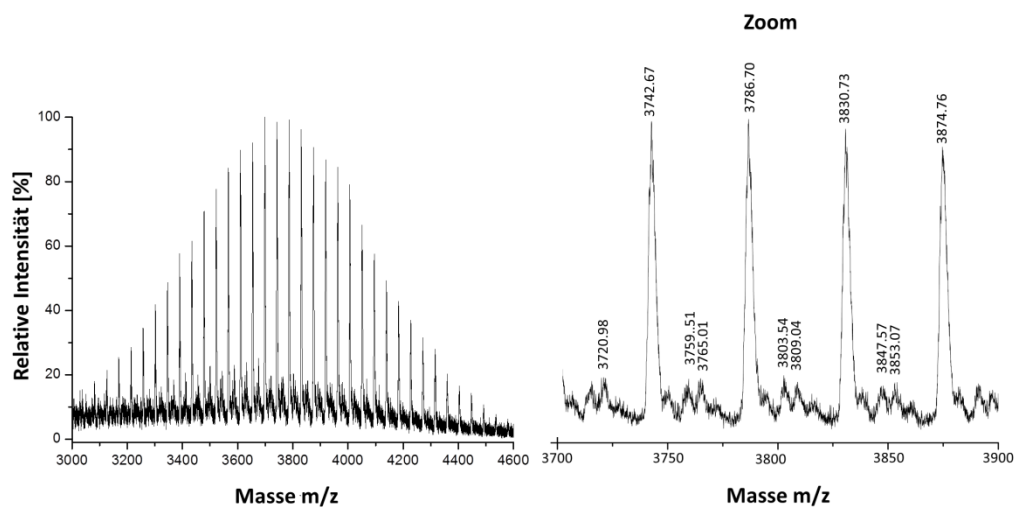
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4234.43 \, \text{Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{H}} = 4234.43 \, \text{Da}.$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d<sub>1</sub>, δ in ppm): 8.71 (m, 1H, CH<sub>Ar, H</sub>), 7.55 (m, 1H, CH<sub>Ar, H</sub>), 7.45-7.28 (m, 10H, CH<sub>Ar, F</sub>), 5.23-5.14 (m, 2H, CH<sub>F</sub>), 5.01-4.95 (m, 1H, CH<sub>R</sub>), 4.85-4.70 (m, 4H, CH<sub>N,K,H</sub>), 4.15-4.09 (m, 4H, CH<sub>2, PEG</sub>), 4.05-3.96 (m, 350H, CH<sub>2, PEG</sub>), 3.67-3.06 (m, 14H, CH<sub>2, F,K,R,N</sub>), 2.18-2.06 (m, 2H, CH<sub>2, R</sub>), 2.05-1.59 (m, 14H, CH<sub>2, H,K</sub>).

FT-IR (ν(cm<sup>-1</sup>)): 3411 (vw), 2884 (s), 2743 (w), 1973 (w), 1667 (m), 1538 (w), 1465 (w), 1343 (m), 1280 (w), 1241 (w), 1202 (w), 1144 (w), 1099 (vs), 958 (m), 841 (m), 698 (w), 585 (w), 507 (w), 467 (w).

Pep<sub>1</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG (GFQQSGF-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 66.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3720.98$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3719.89 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3742.67$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3741.87 \text{ Da}$$

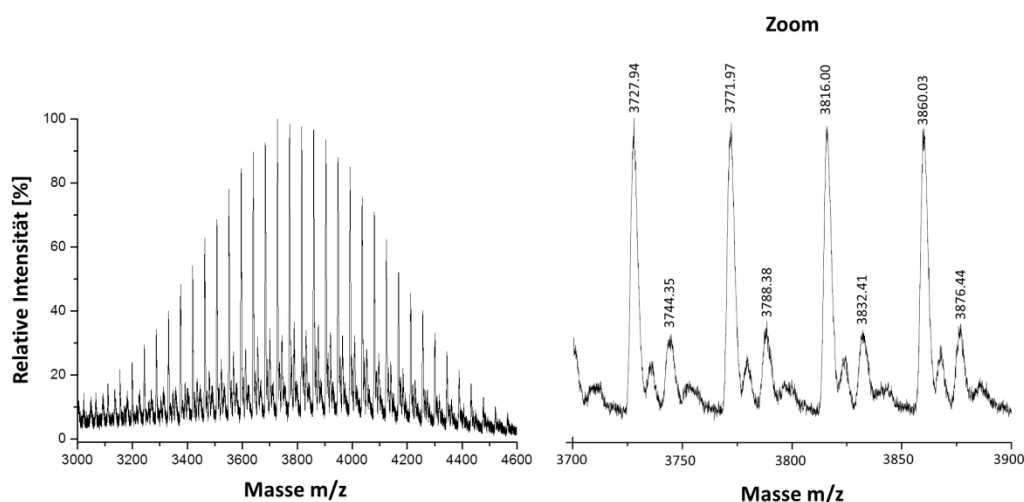
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3759.51$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3757.98 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(65)} + M_{\text{H}} = 3719.89 \text{ Da}.$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.29-7.03 (m, 10H, CH<sub>Ar, F</sub>), 4.92-4.60 (m, 6H, CH<sub>F, Q, S</sub>), 4.23-4.14 (m, 4H, CH<sub>2, G</sub>), 4.11-4.03 (m, 2H, CH<sub>2, S</sub>), 3.94-3.76 (m, 312H, CH<sub>2, PEG</sub>), 3.71-3.41 (m, 4H, CH<sub>2, F</sub>), 3.15-2.95 (m, 4H, CH<sub>2, Q</sub>), 2.68-2.09 (m, 4H, CH<sub>2, Q</sub>).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3284 (w), 2884 (vs), 2742 (vw), 2697 (w), 1975 (w), 1665 (s), 1632 (s), 1528 (w), 1466 (m), 1343 (s), 1280 (s), 1240 (m), 1201 (w), 1145 (s), 1102 (vs), 1065 (m), 959 (s), 842 (s), 701 (w), 457 (w).

Pep<sub>2</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG (SFFQGGL-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 67.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3771.97$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3770.93 \text{ Da}$$

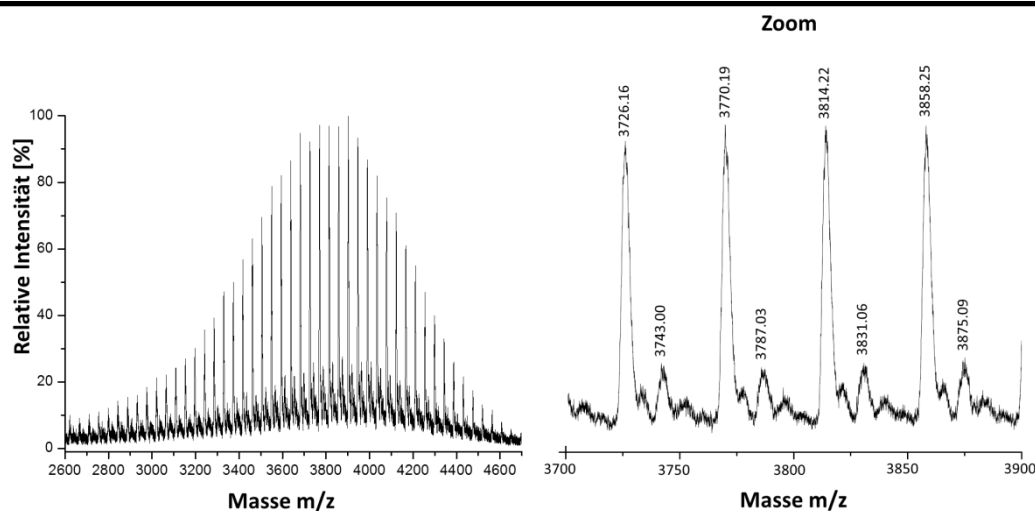
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3788.38$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3787.04 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(66)} + M_{\text{H}} = 3770.93 \text{ Da.}$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.28-7.00 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>, F), 4.94-4.50 (m, 5H, CH<sub>F,Q,S,L</sub>), 4.31-4.17 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, G), 4.16-4.14 (m, 1H, CH<sub>L</sub>), 4.11-4.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, S), 3.94-3.73 (m, 326H, CH<sub>2</sub>, PEG), 3.62-3.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Q), 3.12-2.88 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, F), 2.62-2.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Q), 1.73-1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, L), 0.92-0.85 (m, 6H, CH<sub>3</sub>, L).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3283 (m), 3080 (w), 2885 (vs), 2741 (vw), 2696 (vw), 2323 (vw), 1972 (w), 1665 (m), 1631 (s), 1527 (w), 1465 (m), 1408 (vw), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1100 (vs), 958 (s), 842 (s), 699 (w), 460 (w).



**Abb. 68.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3858.25$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3858.38 \text{ Da}$$

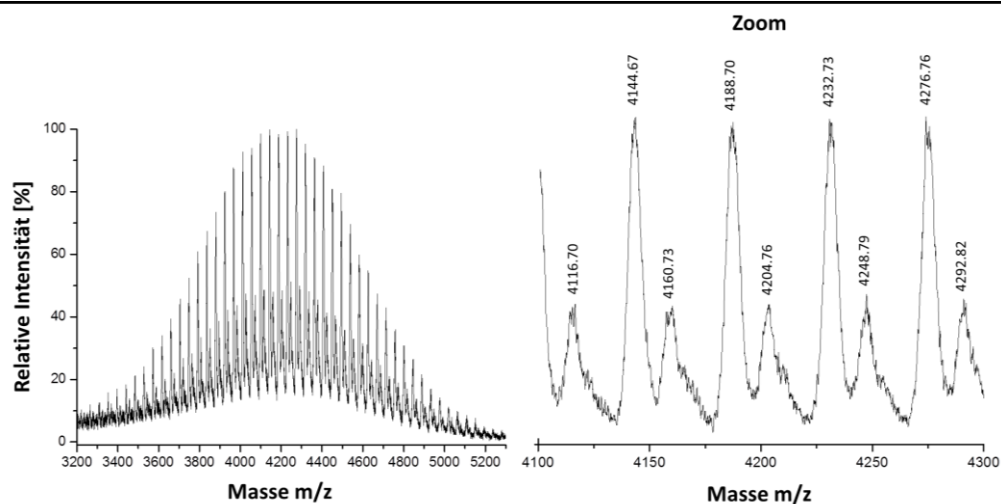
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3875.09$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3874.49 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(66)} + M_{\text{H}} = 3858.38 \text{ Da}.$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.25-6.99 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>, F), 4.86-4.58 (m, 7H, CH<sub>S,F,L,Q</sub>), 4.28-4.17 (m, 2H, CH<sub>L</sub>), 4.14-4.05 (m, 4H, CH<sub>2,S</sub>), 3.94-3.76 (m, 324H, CH<sub>2,PEG</sub>), 3.64-3.55 (m, 2H, CH<sub>2,Q</sub>), 3.12-2.87 (m, 4H, CH<sub>2,F</sub>), 2.66-2.03 (m, 2H, CH<sub>2,Q</sub>), 1.71-1.39 (m, 4H, CH<sub>2,L</sub>), 0.97-0.79 (m, 12H, CH<sub>3,L</sub>).

FT-IR (ν(cm<sup>-1</sup>)): 3282 (m), 3084 (w), 2886 (vs), 2741 (vw), 2696 (vw), 1975 (w), 1630 (s), 1526 (w), 1466 (m), 1343 (s), 1280 (m), 1240 (m), 1202 (w), 1145 (m), 1099 (vs), 959 (s), 842 (s), 699 (w), 460 (w).

Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG (SFFSFFQ-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 69.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4188.70$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4189.28 \text{ Da}$$

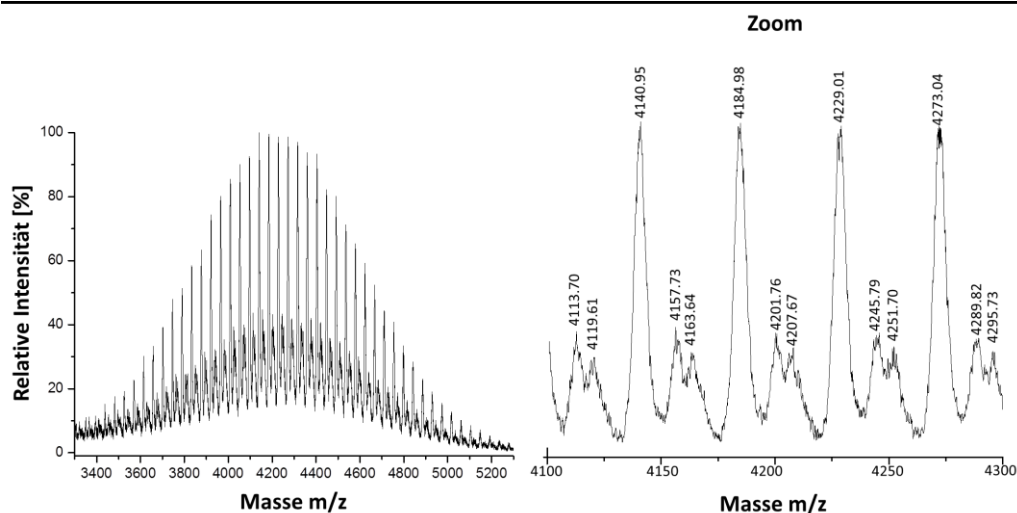
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4204.76$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4205.39 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{Na}} = 4189.28 \text{ Da.}$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.34-6.94 (m, 20H, CH<sub>Ar, F</sub>), 4.99-4.58 (m, 7H, CH<sub>S, F, Q</sub>), 4.07-3.73 (m, 298H, CH<sub>2, PEG, S</sub>), 3.64-3.50 (m, 2H, CH<sub>2, S</sub>), 3.22-2.84 (m, 8H, CH<sub>2, F</sub>), 2.72-2.04 (m, 4H, CH<sub>2, Q</sub>).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3278 (m), 3068 (vw), 2886 (vs), 2741 (w), 2696 (w), 1985 (w), 1669 (m), 1630 (s), 1533 (w), 1465 (m), 1411 (vw), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1201 (m), 1098 (vs), 958 (m), 842 (m), 746 (w), 699 (m), 571 (m), 508 (m), 445 (w).



**Abb. 70.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4207.67$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4209.33 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4229.01$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4231.32 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4245.79$$

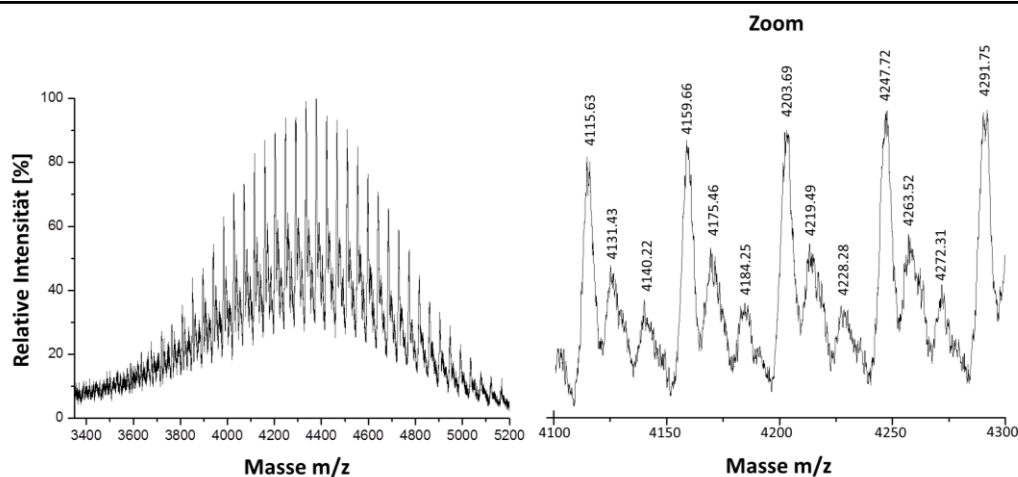
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4247.42 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{H}} = 4209.33 \text{ Da.}$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.32-6.91 (m, 20H, CH<sub>Ar</sub>, F), 5.00-4.57 (m, 7H, CH<sub>S,F,E,Q</sub>), 4.07-3.71 (m, 312H, CH<sub>2</sub>, PEG, S), 3.64-3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, S), 3.14-2.82 (m, 8H, CH<sub>2</sub>, F), 2.69-2.42 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, Q), 2.31-1.91 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, E).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3470 (w), 3277 (m), 3085 (w), 2885 (vs), 2741 (w), 2696 (w), 1633 (s), 1550 (w), 1466 (m), 1404 (vw), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1099 (vs), 959 (m), 842 (m), 748 (w), 701 (w), 646 (w), 573 (m), 508 (m), 476 (m), 444 (w).



Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG (FFQKQQG-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 71.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4140.22$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4140.27 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4159.66$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4162.26 \text{ Da}$$

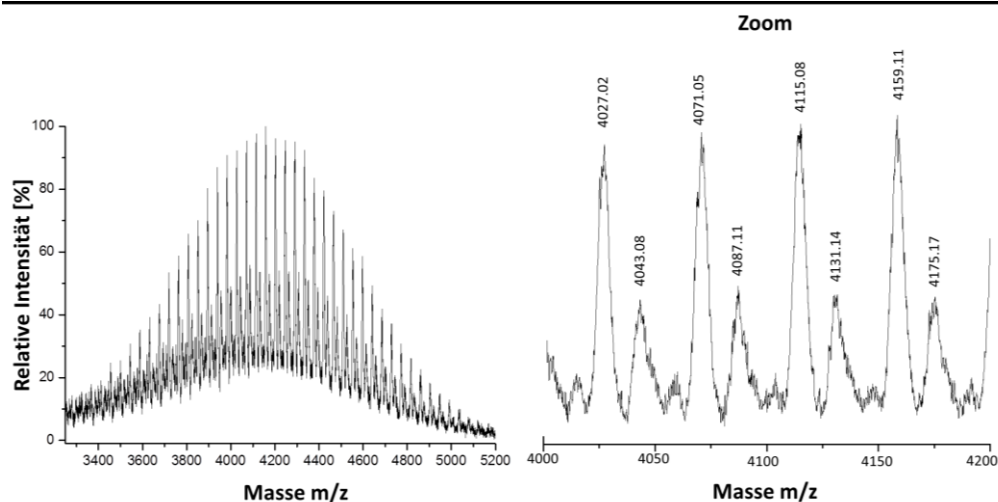
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4175.46$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4178.37 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{H}} = 4140.27 \text{ Da.}$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.37-7.03 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>, F), 4.90-4.52 (m, 7H, CH<sub>F,Q,K,G</sub>), 4.26-4.19 (m, 2H, CH<sub>2,G</sub>), 4.07-3.71 (m, 470H, CH<sub>2,PEG</sub>), 3.66-3.60 (m, 2H, CH<sub>2,K</sub>), 3.37-2.98 (m, 4H, CH<sub>2,F</sub>), 2.78-1.79 (m, 16H, CH<sub>2,Q,K</sub>), 1.73-1.53 (m, 2H, CH<sub>2,K</sub>).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3285 (m), 3077 (w), 2887 (vs), 2741 (w), 2697 (w), 1664 (m), 1626 (m), 1531 (w), 1466 (m), 1413 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1146 (m), 1098 (vs), 958 (m), 842 (m), 700 (w), 586 (s), 573 (m), 508 (m), 472 (m).



**Abb. 72.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4071.05$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4072.21 \text{ Da}$$

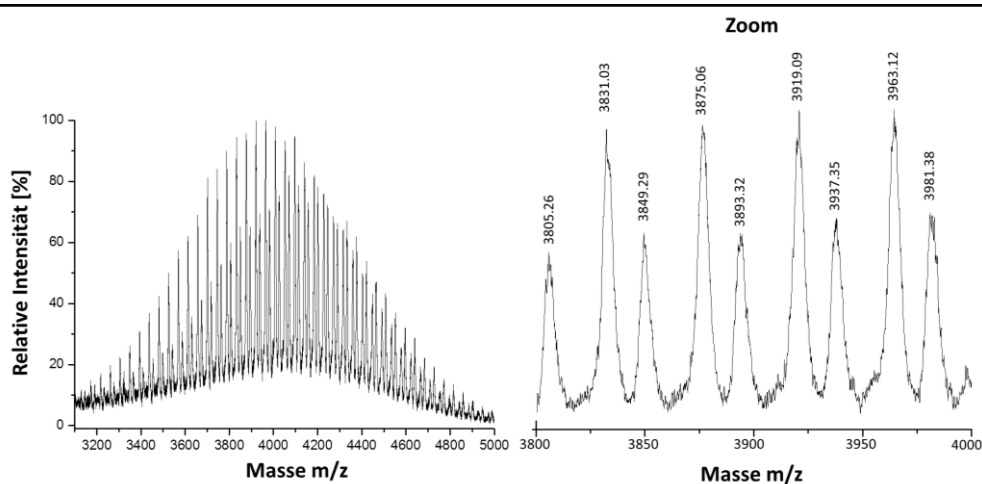
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4087.11$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4088.32 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(72)} + M_{\text{H}} = 4072.21 \text{ Da.}$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.44-7.23 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>, F), 5.09-4.73 (m, 7H, CH<sub>K,Q,L,F,G,S</sub>), 4.60-4.28 (m, 4H, CH<sub>2,G</sub>, CH<sub>L</sub>), 4.20-3.94 (m, 382H, CH<sub>2,PEG</sub>), 3.81-3.74 (m, 2H, CH<sub>2,S</sub>), 3.45-3.35 (m, 2H, CH<sub>2,F</sub>), 3.28-3.20 (m, 2H, CH<sub>2,Q</sub>), 2.80-2.69 (m, 2H, CH<sub>2,K</sub>), 2.51-2.17 (m, 4H, CH<sub>2,K,Q</sub>), 2.08-1.72 (m, 8H, CH<sub>2,L,K</sub>), 1.12-0.99 (m, 12H, CH<sub>3,L</sub>).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3278 (m), 3081 (w), 2885 (vs), 2741 (w), 2696 (w), 1632 (m), 1544 (w), 1466 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1203 (m), 1146 (m), 1100 (vs), 959 (m), 842 (m), 700 (w), 587 (s), 508 (m), 472 (m).

Pep<sub>2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG (KQLFLGS-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 73.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3919.09$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3917.19 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3937.35$$

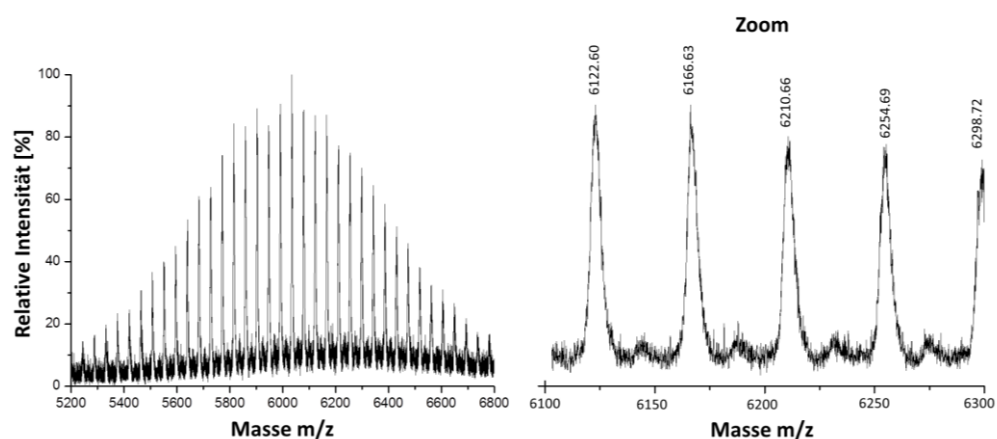
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3939.17 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(66)} + M_{\text{H}} = 3917.19 \text{ Da}.$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d,  $\delta$  in ppm): 7.49-7.22 (m, 10H, CH<sub>Ar, F</sub>), 5.11-4.61 (m, 9H, CH<sub>Q,F,L</sub>, CH<sub>L</sub>), 4.22-3.85 (m, 302H, CH<sub>2, PEG</sub>), 3.79-3.14 (m, 6H, CH<sub>2, Q</sub>), 2.97-2.69 (m, 4H, CH<sub>2, F</sub>), 2.52-2.24 (m, 6H, CH<sub>2, Q</sub>), 1.90-1.64 (m, 4H, CH<sub>2, L</sub>), 1.21-0.97 (m, 12H, CH<sub>3, L</sub>).

FT-IR ( $\nu(\text{cm}^{-1})$ ): 3411 (w), 3269 (m), 3086 (w), 2885 (vs), 2741 (w), 2696 (w), 1663 (m), 1631 (s), 1553 (m), 1466 (m), 1409 (w), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1099 (vs), 959 (m), 842 (m), 700 (w), 587 (s), 509 (m), 472 (m).

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (FFHHKKK-PEG<sub>5.2k</sub>)



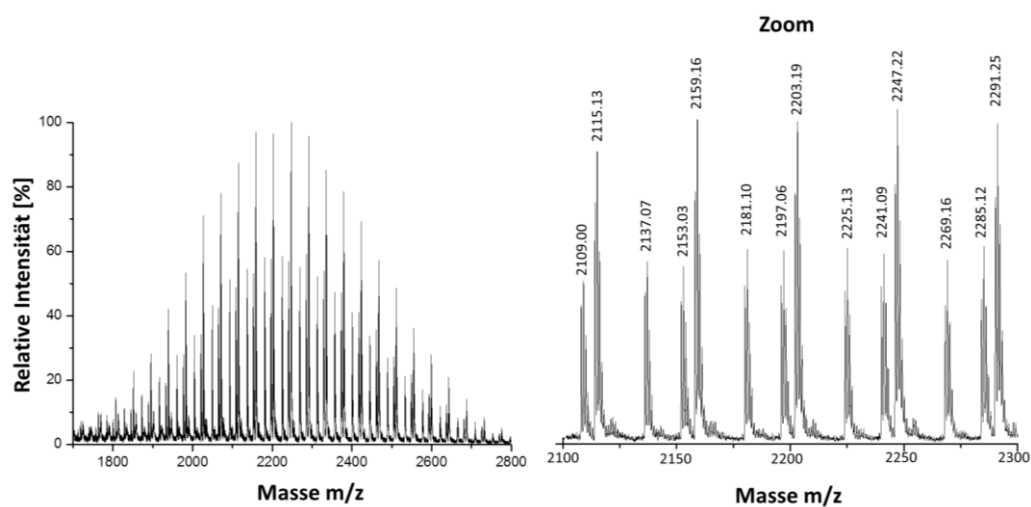
**Abb. 74.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>.

$$M_{\text{Peak}}[M+H]^+ = m/z \ 6254.69$$

$$M_{\text{ber}}[M+H]^+ = 6254.84 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(118)} + M_{\text{H}} = 6254.84 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (FFHHKKK-PEG<sub>1.4k</sub>)



**Abb. 75.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>.

$$M_{\text{Peak}}[M+H]^+ = m/z \ 2247.22$$

$$M_{\text{ber}}[M+H]^+ = 2248.11 \text{ Da}$$

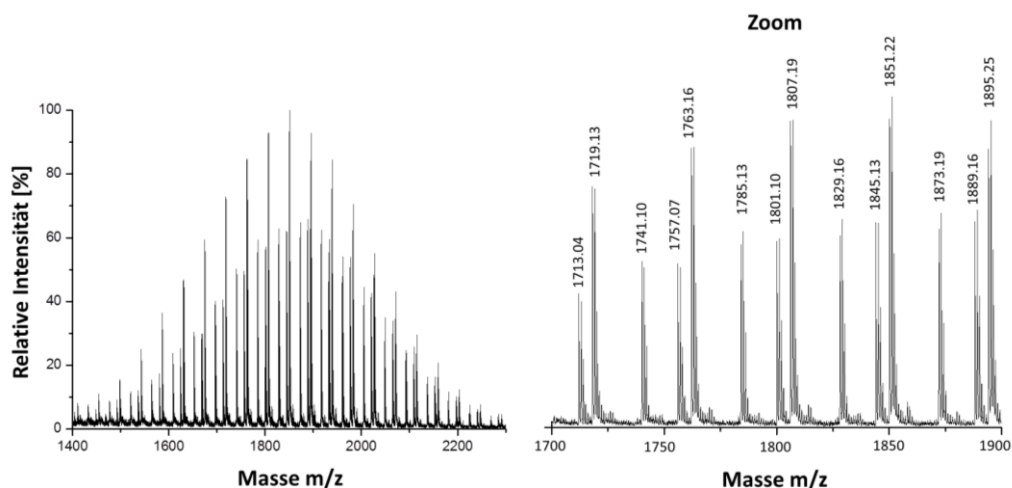
$$M_{\text{Peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 2269.16$$

$$M_{\text{ber}}[M+Na]^+ = 2270.09 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[M+K]^+ = m/z \ 2285.12$$

$$M_{\text{ber}}[M+K]^+ = 2286.20 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(27)} + M_{\text{H}} = 2248.11 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (FFHHKKK-PEG<sub>0.85k</sub>)**Abb. 76.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>0.85k</sub>.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 1851.22$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 1851.84 \text{ Da}$$

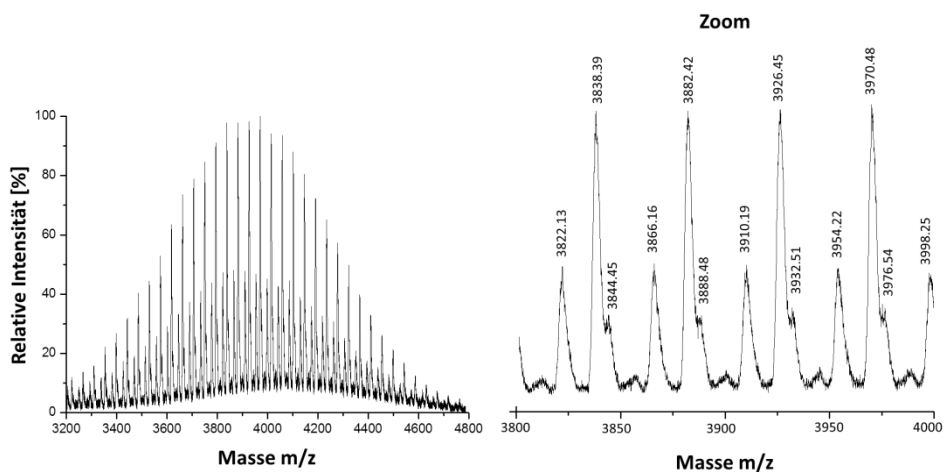
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 1873.19$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1873.82 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 1889.16$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 1889.93 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(18)} + M_{\text{H}} = 1851.84 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala1</sub>-PEG (AFHHKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)**Abb. 77.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala1</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3932.51$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3933.21 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3954.22$$

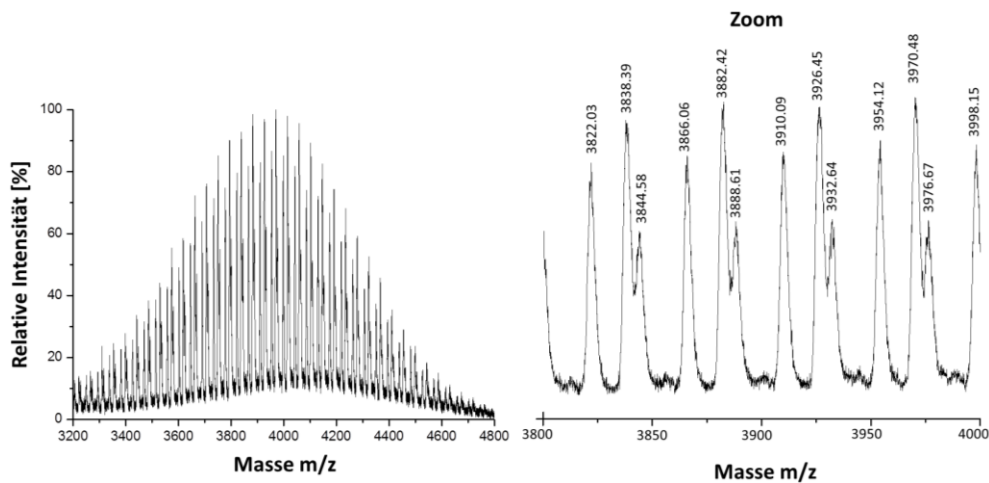
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3955.19 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3970.48$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3971.30 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3933.21 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala2</sub>-PEG (FAHHKKK-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 78.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala2</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3932.64$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3933.21 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3954.12$$

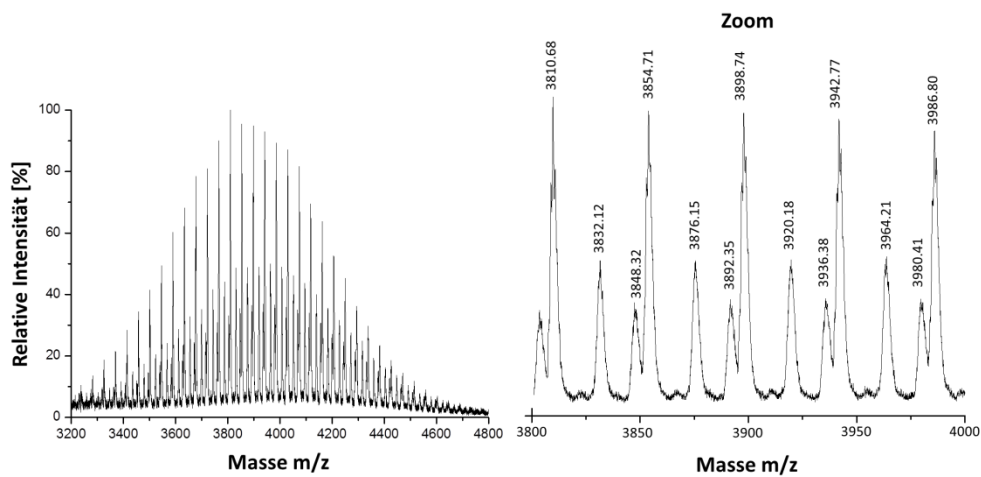
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3955.19 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3970.48$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3971.30 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3933.21 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala3</sub>-PEG (FFAHKKK-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 79.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala3</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3942.77$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3943.25 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3964.21$$

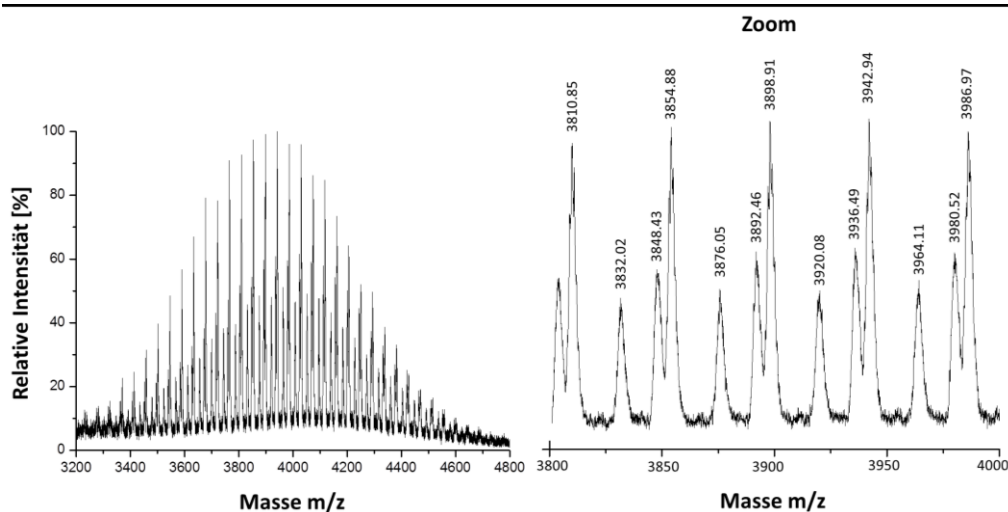
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3965.23 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3980.41$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3981.34 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3943.25 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala4</sub>-PEG (FFHAKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 80.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala4</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3942.94$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3943.25 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3964.11$$

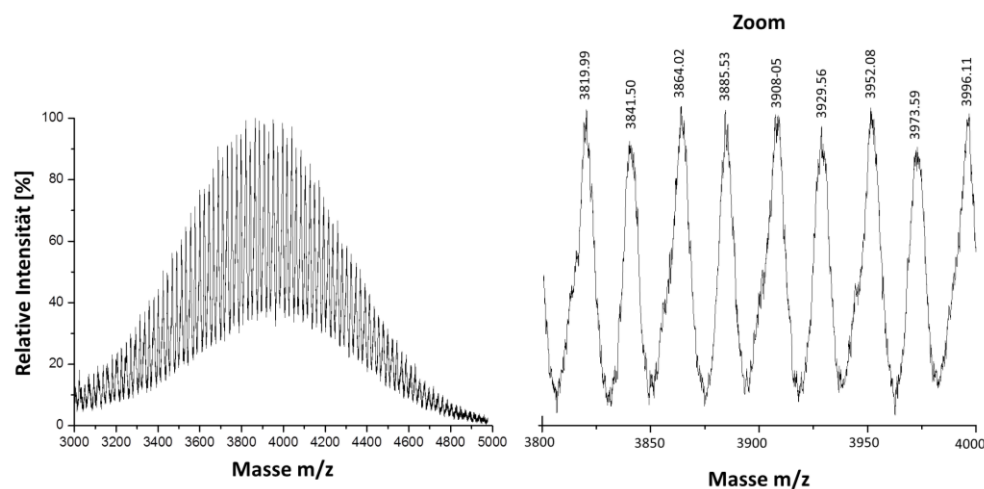
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3965.23 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3980.52$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3981.34 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3943.25 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala5</sub>-PEG (FFHHAKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 81.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala5</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3952.08$$

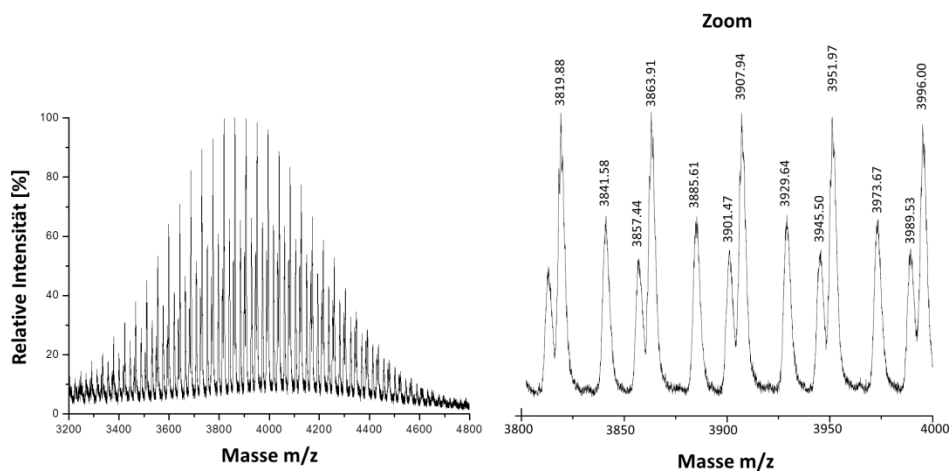
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3952.21 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3973.59$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3974.19 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3952.21 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala6</sub>-PEG (FFHHKAK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 82.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala6</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3951.97$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3952.21 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3973.67$$

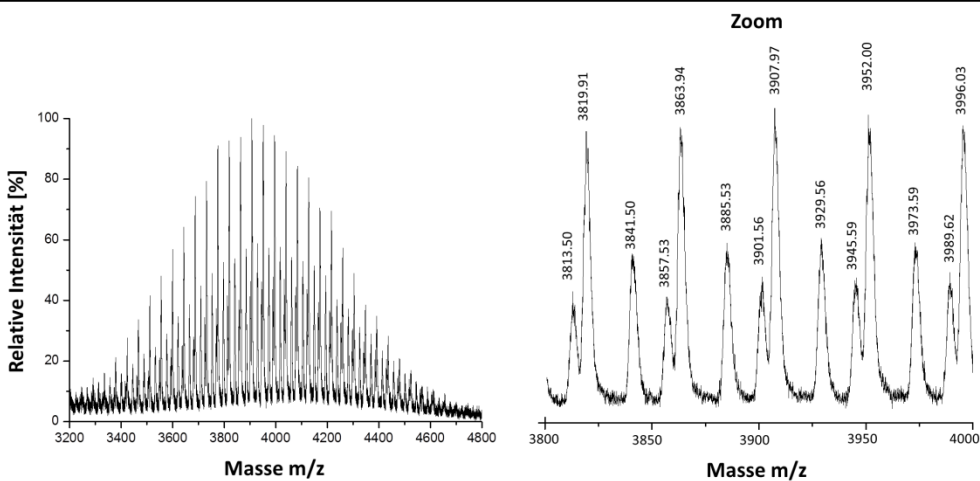
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3974.19 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3989.53$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3989.66 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3952.21 \text{ Da}.$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala7</sub>-PEG (FFHHKKA-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 83.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala7</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3952.00$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3952.21 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3973.59$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3974.19 \text{ Da}$$

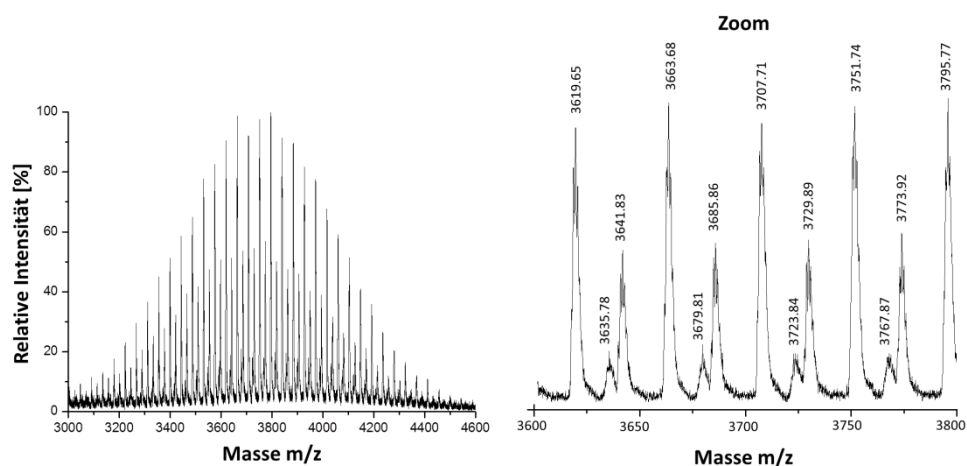
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3989.62$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3989.66 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(67)} + M_{\text{H}} = 3952.21 \text{ Da}.$$



Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser1</sub>-PEG (SFHHKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 84.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser1</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3729.89$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3729.06 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3751.74$$

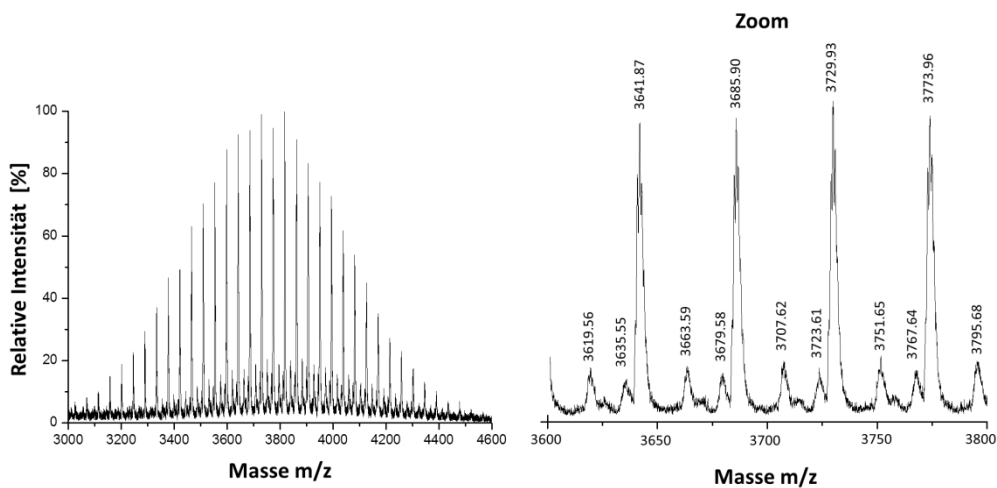
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3751.04 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3767.87$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3767.15 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3729.06 \text{ Da}.$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser2</sub>-PEG (FSHHKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 85.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser2</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3729.93$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3729.06 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3751.65$$

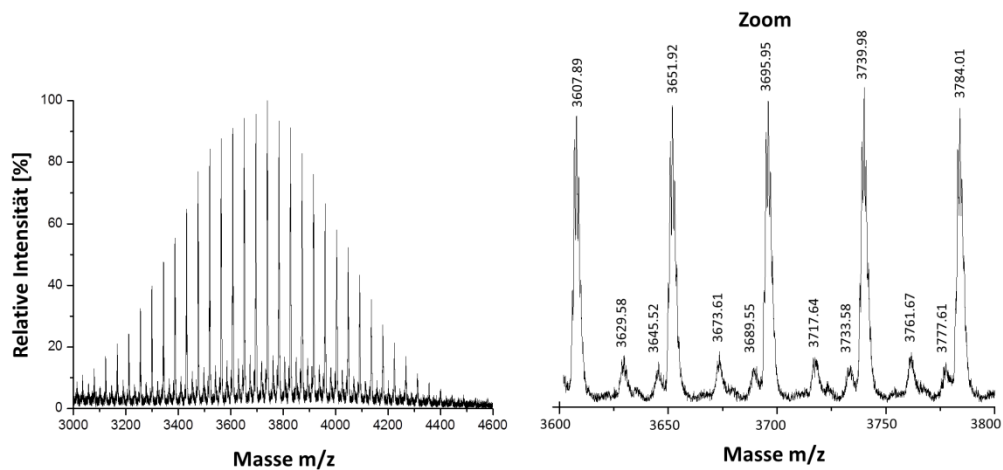
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3751.04 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3767.64$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3767.15 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3729.06 \text{ Da}.$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser3</sub>-PEG (FFSHKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 86.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser3</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3739.98$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3739.10 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3761.67$$

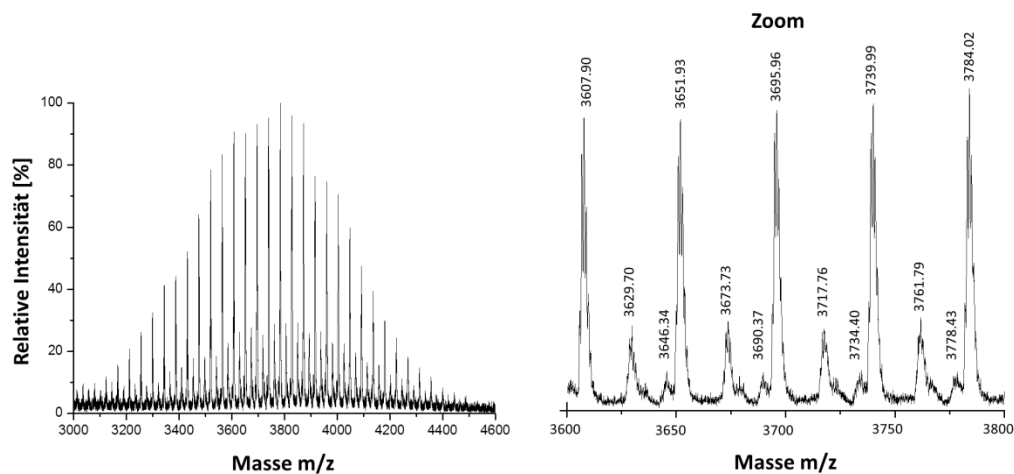
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3761.08 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3777.61$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3777.19 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3739.10 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser4</sub>-PEG (FFHSHKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 87.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser4</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3739.99$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3739.10 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3761.79$$

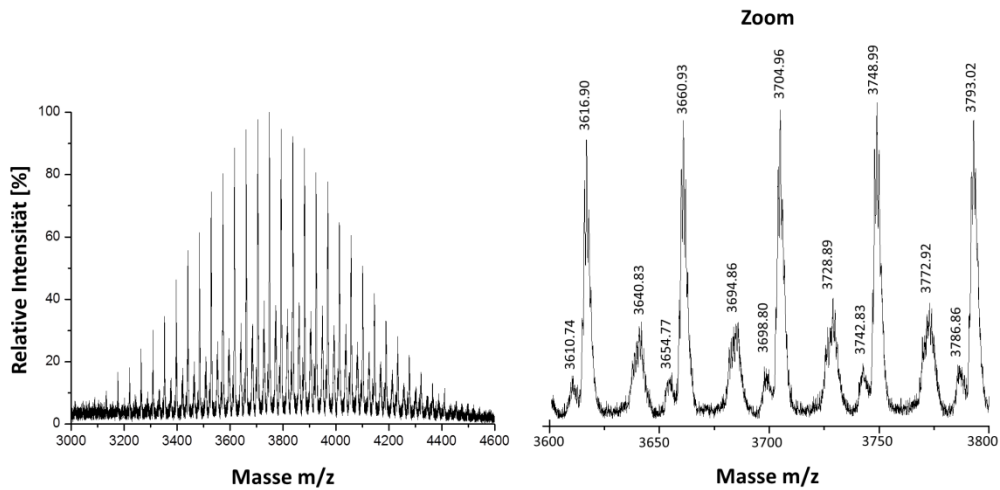
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3761.08 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3778.43$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3777.19 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3739.10 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser5</sub>-PEG (FFHHSKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 88.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser5</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3748.99$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3748.06 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3772.92$$

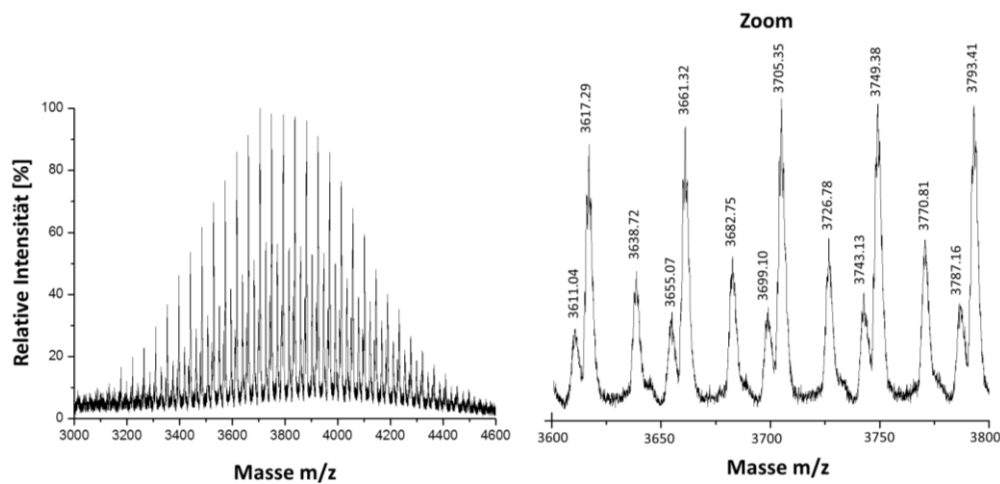
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3770.04 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3786.86$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3786.15 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3748.06 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser6</sub>-PEG (FFHHKSK-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 89.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser6</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3749.38$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3748.06 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3770.81$$

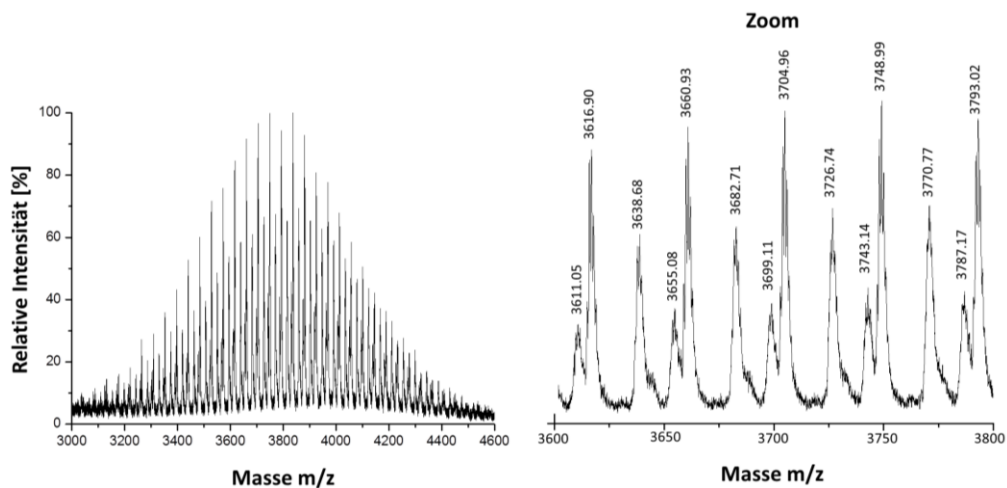
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3770.04 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3787.16$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3786.15 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3748.06 \text{ Da.}$$

Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser7</sub>-PEG (FFHHKKS-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 90.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ser7</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 3748.99$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 3748.06 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 3770.77$$

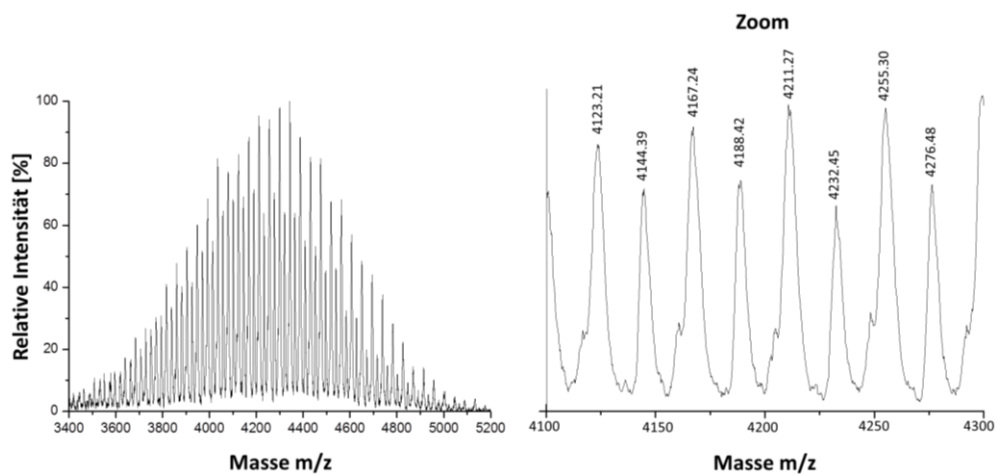
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3770.04 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 3787.17$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 3786.15 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(62)} + M_{\text{H}} = 3748.06 \text{ Da.}$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala1</sub>-PEG (AKHFNTF-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 91.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala1</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4255.30$$

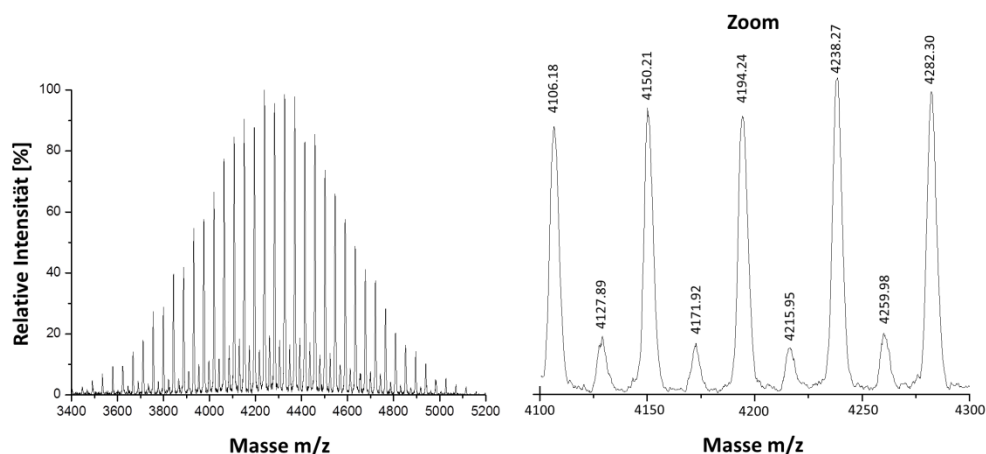
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4254.35 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4276.48$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4276.33 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4254.35 \text{ Da.}$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala2</sub>-PEG (RAHFNTF-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 92.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala2</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4282.30$$

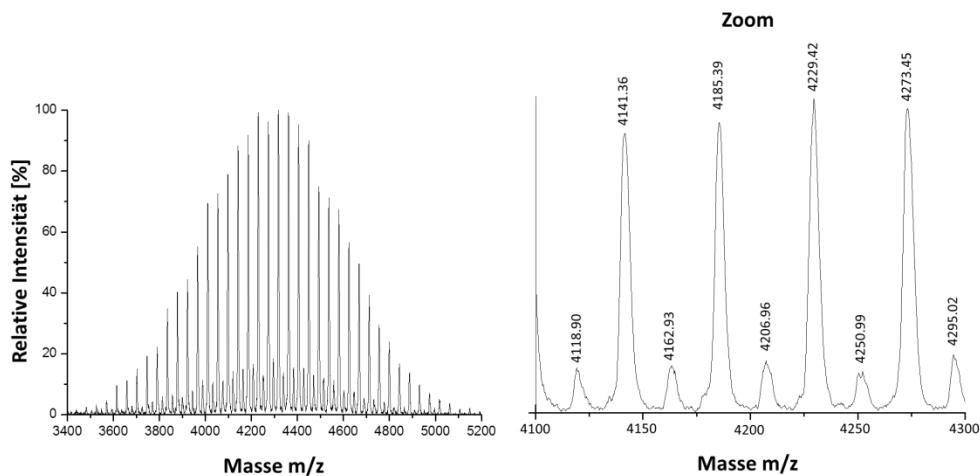
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4282.36 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4304.01$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4304.34 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4282.36 \text{ Da.}$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala3</sub>-PEG (RKAFNTF-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 93.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala3</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4273.45$$

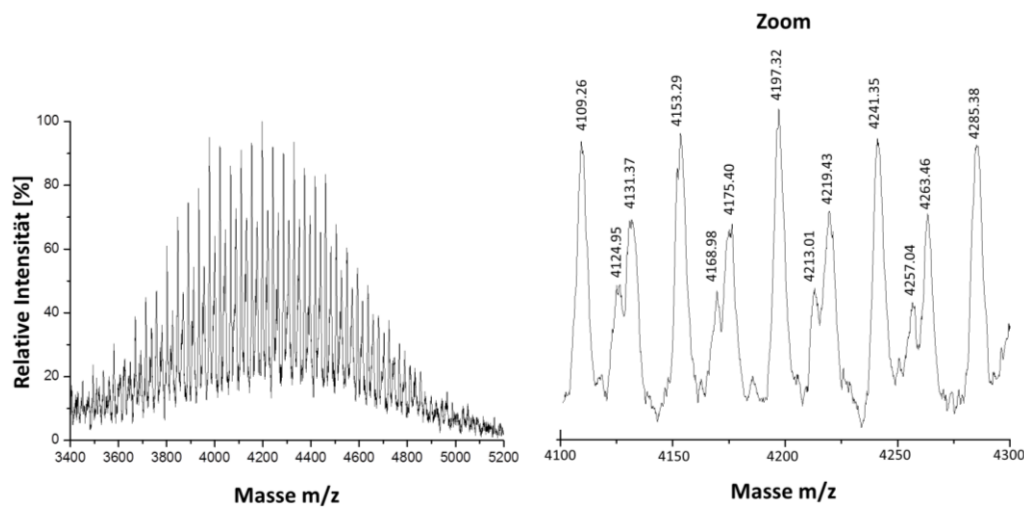
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4273.39 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4295.02$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4295.37 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4273.39 \text{ Da.}$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala4</sub>-PEG (RKHANTF-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 94.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala4</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4263.46$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4263.36 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4285.38$$

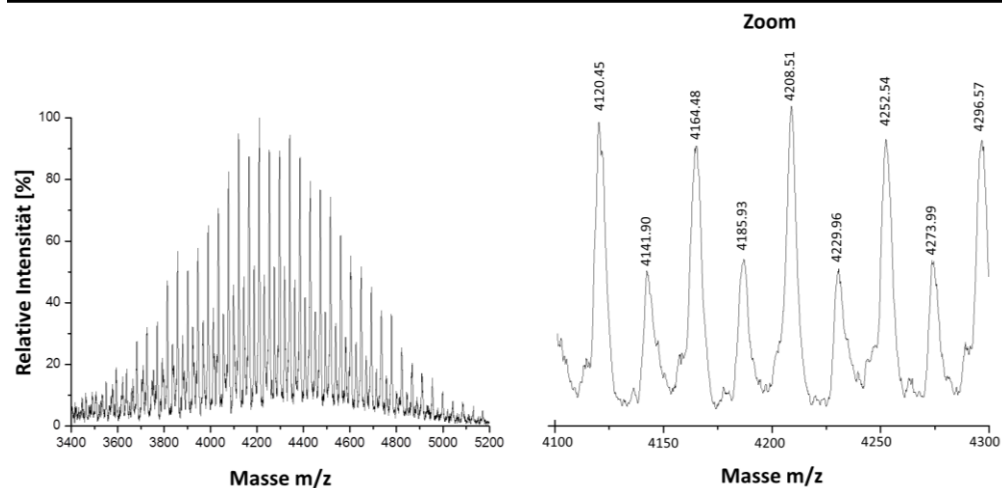
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4285.34 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4301.07$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4301.45 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4263.36 \text{ Da.}$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala5</sub>-PEG (RKHFATF-PEG<sub>3,2k</sub>)



**Abb. 95.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala5</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4296.57$$

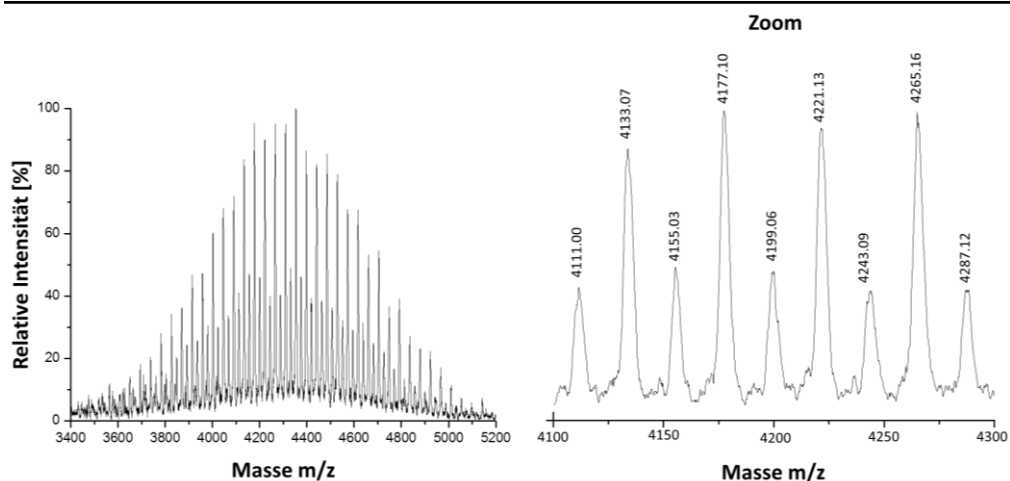
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4296.43 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4318.02$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4318.41 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4296.43 \text{ Da.}$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala6</sub>-PEG (RKHFNAF-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 96.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala6</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4309.19$$

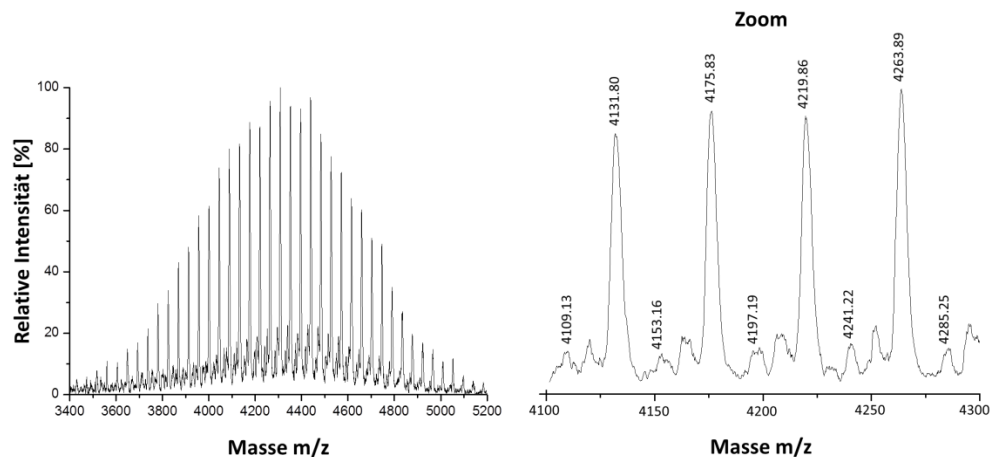
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4309.43 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4331.15$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4331.41 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4309.43 \text{ Da}.$$

Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala7</sub>-PEG (RKHFNTA-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 97.** MALDI-TOF-MS von Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup><sub>Ala7</sub>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4263.89$$

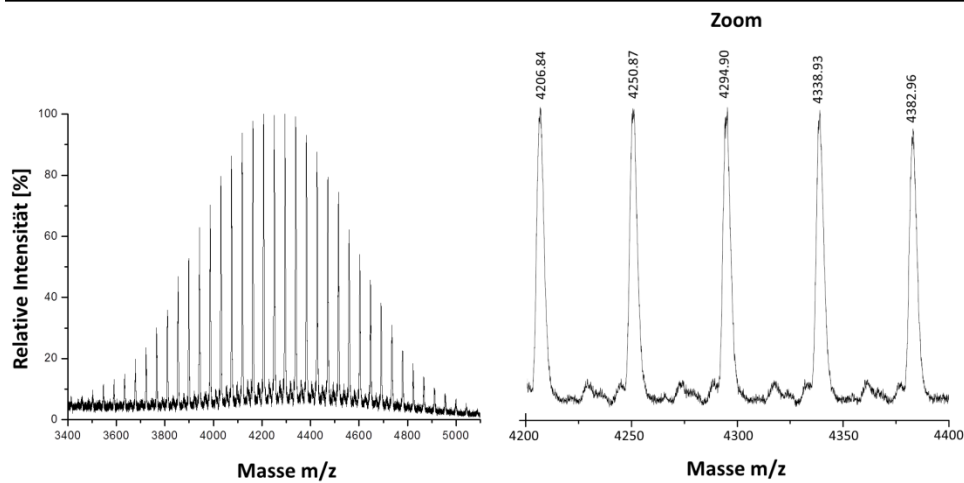
$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4263.36 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4285.25$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4285.34 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(75)} + M_{\text{H}} = 4263.36 \text{ Da}.$$

Pal-GG-Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (Pal-GG-FFHHKKK-PEG<sub>3.2k</sub>)



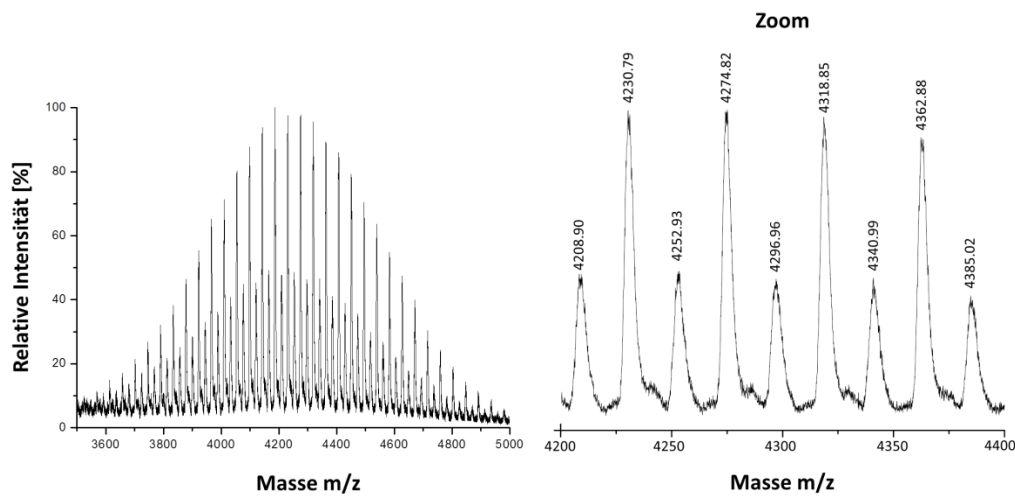
**Abb. 98.** MALDI-TOF-MS von Pal-GG-Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 4294.90$$

$$M_{\text{ber}}[M+\text{Na}]^+ = 4294.74 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(65)} + M_{\text{Na}} = 4294.74 \text{ Da.}$$

Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG (Pal-GG-RKHFNTF-PEG<sub>3.2k</sub>)



**Abb. 99.** MALDI-TOF-MS von Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[M+\text{H}]^+ = m/z \ 4252.93$$

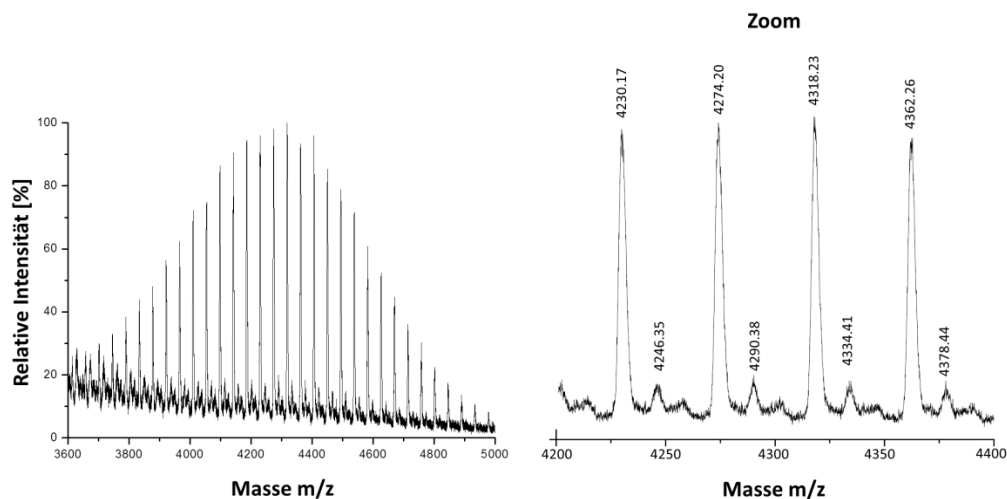
$$M_{\text{ber}}[M+\text{H}]^+ = 4250.67 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 4274.82$$

$$M_{\text{ber}}[M+\text{Na}]^+ = 4272.65 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(65)} + M_{\text{H}} = 4250.67 \text{ Da.}$$



Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG (Pal-GG-SFFEFFQ-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 100.** MALDI-TOF-MS von Pal-GG-Pep<sub>2</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG.

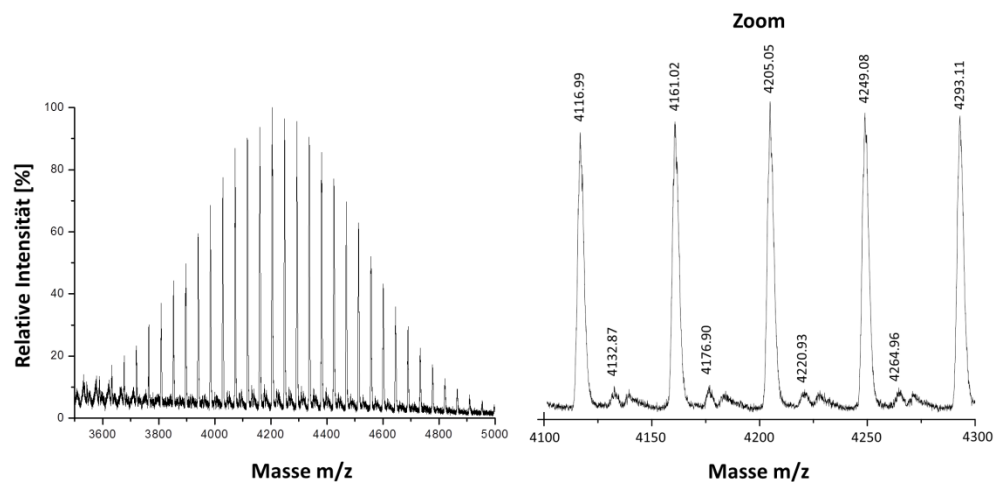
$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4274.20$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4274.62 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4290.38$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4285.34 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(65)} + M_{\text{Na}} = 4274.62 \text{ Da.}$$

Pal-GG-Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG (Pal-GG-FFQKQQG-PEG<sub>3,2k</sub>)**Abb. 101.** MALDI-TOF-MS von Pal-GG-Pep<sub>3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG.

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4205.05$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4205.56 \text{ Da}$$

$$M_{\text{Peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4220.93$$

$$M_{\text{ber}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4221.67 \text{ Da}$$

$$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}(65)} + M_{\text{H}} = 4205.56 \text{ Da.}$$

## 6.4. Charakterisierung der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe

### 6.4.1. Solubilisierungsexperimente<sup>[13a]</sup>

**B4A1:** Je 2.44  $\mu\text{mol}$  der B4A1-affinen Peptid-Polymer-Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{B4A1})}$ -PEG wurden in 1 mL Wasser ( $\text{pH} = 7$ ) gelöst und zu 1 mg (2.44  $\mu\text{mol}$ ) B4A1, gelöst in 1 mL DMSO gegeben. Nachdem die Substanzmischungen für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt wurden, wurden sie über Nacht gefriergetrocknet. In je 1 mL Wasser wurden die Rückstände gelöst. Um Wirkstoffmoleküle, die nicht von den Konjugaten solubilisiert wurden, von den Wirkstoff-Transporter-Komplexen abtrennen zu können, wurden die Lösungen zentrifugiert (30 min, 10 000 rpm). Von den Überständen wurden in mit DMSO verdünnter Form (1:80, v/v) UV/Vis-Spektren aufgenommen, um die maximalen Beladungskapazitäten bestimmen zu können (**Tab. 12**). Die Berechnungen der Kapazitäten erfolgten durch Nutzung einer Kalibrationskurve von B4A1 in DMSO. Dafür wurden für die Konzentrationen 0.02 mg/mL, 0.018 mg/mL, 0.015 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.008 mg/mL, 0.005 mg/mL, 0.002 mg/mL an B4A1 in DMSO die zugehörigen UV/Vis-Absorptionswerte bei 384 nm bestimmt.<sup>[8b]</sup>

**Tab. 12.** Übersicht der Konzentrationen an solubilisiertem Wirkstoff B4A1 durch  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{B4A1})}$ -PEG, Cremophor ELP, PEG und Wasser.<sup>[8b]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mM]	c B4A1 vor Beladung [mM]	c B4A1 nach Solubilisierung [mM]	Verhältnis B4A1: Konjugat
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG	2.44	2.44	2.04	1:1.2 $\pm$ 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG	2.44	2.44	2.31	1:1.1 $\pm$ 0.1
$\text{Pep}_3^{(\text{B4A1})}$ -PEG	2.44	2.44	1.59	1:1.5 $\pm$ 0.4
Wasser ohne Transporter	-	2.44	0.15	-
PEG <sub>2000</sub>	2.44	2.44	0.25	1:9.8 $\pm$ 0.3
Cremophor ELP	2.44	2.44	0.33	1:7.4 $\pm$ 2.5

Die Beladungen der Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala1-7}}$ -PEG,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser1-7}}$ -PEG,  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala1-7}}$ -PEG,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub>,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> und  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>0.85k</sub> mit B4A1 erfolgte nach der für die Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{B4A1})}$ -PEG beschriebenen Beladungsprozedur. In den **Tabellen 13-16** wurden die maximalen Beladungskapazitäten der Konjugate in Übersichten dargestellt. Zudem wurden dort die Konzentrationen an B4A1 vor und nach der Beladung und die jeweiligen Wirkstoff:Transporter-Verhältnisse im Wirkstoff-Konjugat-Komplex angegeben.<sup>[162]</sup>

**Tab. 13.** Darstellung der B4A1-Konzentrationen vor und nach der Beladung der Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala1-7-PEG}}$ . Zusätzlich wurden die B4A1:Konjugat-Verhältnisse im resultierenden Wirkstoff-Konjugat-Komplex aufgeführt.<sup>[162]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mmol]	c B4A1 vor Beladung [mmol]	c B4A1 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis B4A1: Konjugat
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$	2.44	2.44	2.04	1:1.2 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala1}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.06	1:2.3 ± 0.2
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala2}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.41	1:1.7 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala3}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.55	1:1.6 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala4}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.75	1:1.4 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala5}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.73	1:1.4 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala6}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.53	1:1.6 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala7}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.10	1:2.2 ± 0.1

**Tab. 14.** Vor und nach der Beladung der Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser1-7-PEG}}$  mit B4A1 ergaben sich unterschiedliche maximale Wirkstoffkonzentrationen und B4A1:Konjugat-Verhältnisse in den resultierenden Komplexen. Dargestellt wurden die Konzentrationen an B4A1 in Lösung vor und nach der Beladungsprozedur.<sup>[162]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mmol]	c B4A1 vor Beladung [mmol]	c B4A1 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis B4A1: Konjugat
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}\text{-PEG}$	2.44	2.44	2.04	1:1.2 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser1}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	0.71	1:3.4 ± 0.9
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser2}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.61	1:1.5 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser3}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.65	1:1.5 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser4}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.70	1:1.4 ± 0.2
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser5}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.34	1:1.8 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser6}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.56	1:1.6 ± 0.2
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}_{\text{Ser7}}\text{-PEG}$	2.44	2.44	1.62	1:1.5 ± 0.1

**Tab. 15.** Zusammenfassung der Solubilisierung des Wirkstoffs B4A1 durch die Konjugate  $\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala1-7-PEG}}$ .<sup>[162]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mmol]	c B4A1 vor Beladung [mmol]	c B4A1 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis B4A1: Konjugat
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}$ -PEG	2.44	2.44	2.22	1:1.1 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala1}}$ -PEG	2.44	2.44	1.62	1:1.5 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala2}}$ -PEG	2.44	2.44	1.42	1:1.7 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala3}}$ -PEG	2.44	2.44	1.50	1:1.6 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala4}}$ -PEG	2.44	2.44	1.26	1:1.9 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala5}}$ -PEG	2.44	2.44	1.72	1:1.4 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala6}}$ -PEG	2.44	2.44	1.64	1:1.5 ± 0.1
$\text{Pep}_2^{(\text{B4A1})}_{\text{Ala7}}$ -PEG	2.44	2.44	1.92	1:1.3 ± 0.1

**Tab. 16.** Der potentielle Wirkstoff B4A1 wurde durch die Konjugate  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>5.2k</sub>,  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>1.4k</sub> und  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>0.85k</sub> solubilisiert und mit der Solubilisatorkapazität des herkömmlichen Konjugats  $\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG<sub>3.2k</sub> verglichen.<sup>[162]</sup>

Solubilisator	c [Konjugat] [mmol]	c B4A1 vor Beladung [mmol]	c B4A1 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis B4A1: Konjugat
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG <sub>3.2k</sub>	2.44	2.44	2.04	1:1.2 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG <sub>5.2k</sub>	2.44	2.44	2.04	1:1.2 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG <sub>1.4k</sub>	2.44	2.44	0.71	1:3.4 ± 0.1
$\text{Pep}_1^{(\text{B4A1})}$ -PEG <sub>0.85k</sub>	2.44	2.44	nicht messbar	-

**bb14**<sup>[8b]</sup>: Je 2.21 µmol der bb14-affinen Konjugate wurde in 1 mL Wasser (pH = 7) gelöst und langsam zu 1 mg bb14 (2.21 µmol), gelöst in 1 mL DMSO, gegeben. Die Substanzmischungen wurden 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend über Nacht gefriergetrocknet. Nachdem die Rückstände in je 1 mL Wasser gelöst wurden, erfolgte die Zentrifugation der Mischungen (30 min, 10 000 rpm), um Wirkstoffmoleküle abzutrennen, die nicht solubilisiert wurden. Von den Überständen wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen (Verdünnung in DMSO, 1:10, v/v). Die maximalen Beladungskapazitäten wurden durch Abgleich mit einer Kalibrationskurve erreicht (**Tab. 17**). Diese wurden aus Absorptionwerten von bb14 in DMSO bei 451 nm für die Konzentrationen 0.012 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.008 mg/mL, 0.007 mg/mL, 0.006 mg/mL, 0.005 mg/mL, 0.003 mg/mL und 0.002 mg/mL ermittelt.

**Tab. 17.** Darstellung der Konzentrationen vom Wirkstoff bb14 vor und nach der Solubilisierung durch die Peptid-PEG-Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb14})}$ -PEG oder Wasser. Zusätzlich wurden die unterschiedlichen Wirkstoff:Solubilisator-Verhältnisse der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe aufgeführt.<sup>[8b]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mmol]	c bb14 vor Beladung [mmol]	c bb14 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis bb14: Konjugat
$\text{Pep}_1^{(\text{bb14})}$ -PEG	2.21	2.21	0.10	1:22.2
$\text{Pep}_2^{(\text{bb14})}$ -PEG	2.21	2.21	0.13	1:16.6
$\text{Pep}_3^{(\text{bb14})}$ -PEG	2.21	2.21	0.19	1:11.4
Wasser ohne Transporter	-	2.21	0.01	-

bb17<sup>[153]</sup>: bb17 wurde durch die Peptid-Polymer-Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb17})}$ -PEG solubilisiert, indem 2.07  $\mu\text{mol}$  des jeweiligen Konjugats in 1 mL Wasser (pH = 7) gelöst und langsam zu je 1 mg (2.07  $\mu\text{mol}$ ) bb17, gelöst in 1 mL DMSO, gegeben wurde. Nach Schütteln bei Raumtemperatur für 1 h und dem Gefriertrocknen der Mischungen über Nacht wurden die Rückstände in je 1 mL Wasser gelöst und zentrifugiert (30 min, 30 000 rpm). Auf diese Weise konnten nicht-solubilisierter Wirkstoff-Anteile abgetrennt werden. Durch die Aufnahme von UV/Vis-Spektren der Überstände (Verdünnung in DMSO, 1:20, v/v) konnten die maximalen Wirkstoffkapazitäten der Konjugate berechnet werden (**Tab. 18**). Dafür wurden die Absorptionswerte der Überstände bei 473 nm mit denen der Kalibrationskurve von bb17 in DMSO abgeglichen. Dort war die Bestimmung der Absorptionswerte für Konzentrationen von 0.01 mg/mL, 0.0075 mg/mL, 0.006 mg/mL, 0.005 mg/mL und 0.0025 mg/mL bb17 in DMSO erfolgt.

**Tab. 18.** Übersicht der Konzentrationen von bb17 vor und nach der Beladung durch die Peptid-PEG-Konjugate  $\text{Pep}_{1-3}^{(\text{bb17})}$ -PEG, PEG oder Wasser und der Wirkstoff/Konjugat-Verhältnisse in den Komplexen.<sup>[153]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mmol]	c bb17 vor Beladung [mmol]	c bb17 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis bb17: Konjugat
$\text{Pep}_1^{(\text{bb17})}$ -PEG	2.07	2.07	0.250	1:8.3
$\text{Pep}_2^{(\text{bb17})}$ -PEG	2.07	2.07	0.235	1:8.8
$\text{Pep}_3^{(\text{bb17})}$ -PEG	2.07	2.07	0.232	1:8.9
Wasser ohne Transporter	-	2.07	nicht messbar	-
PEG <sub>2000</sub>	2.07	2.07	nicht messbar	-

**bb15**<sup>[153]</sup>: Zur Solubilisierung von bb15 wurden je 2.03 µmol der Konjugate Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG in je 1 mL Wasser (pH = 7) gelöst und langsam zu 1 mg (2.03 µmol) bb15 gegeben. Der Wirkstoff wurde in jeweils 1 mL DMSO gelöst. Die Mischungen wurden 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt, über Nacht gefriergetrocknet und die Rückstände anschließend in 1 mL Wasser gelöst. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Suspensionen (30 min, 30 000 rpm) zur Trennung von nicht-solubilisiertem bb15 von solubilisierten Molekülen. Eine Eichkurve von bb15 in DMSO wurde bei den Konzentrationen 0.015 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.005 mg/mL und 0.002 mg/mL aufgenommen. Durch Abgleich der Absorptionswerte der Eichkurve mit denen der Überstände der solubilisierten Wirkstoffe bei 469 nm konnten die maximalen Beladungskapazitäten der Konjugate ermittelt werden (**Tab. 19**). Die UV/Vis-Spektren der wässrigen Wirkstoff-Konjugat-Komplexe wurden verdünnt in DMSO (1:20, v/v) aufgenommen.

**Tab. 19.** Übersicht der Konzentrationen des Wirkstoffs bb15 vor und nach der Beladung durch die Peptid-PEG-Konjugate Pep<sub>1-2</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, PEG oder Wasser.<sup>[153]</sup>

Solubilisator	c Konjugat [mmol]	c bb15 vor Beladung [mmol]	c bb15 nach Solubilisierung [mmol]	Verhältnis bb15: Konjugat
Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	2.03	2.03	0.114	1:17.1
Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	2.03	2.03	0.367	1:5.5
Wasser ohne Transporter	-	2.03	nicht messbar	-
PEG <sub>2000</sub>	2.03	2.03	0.027	1:76.5

#### 6.4.2. DLS-Experimente<sup>[13a]</sup>

Die hydrodynamischen Radien in wässriger Lösung wurden für die Systeme B4A1/Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, bb14/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG, B4A1/Cremophor ELP, B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>, B4A1/Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>0.85k</sub>, bb17/Pep<sub>1-3</sub>(bb17)-PEG, bb15/Pep<sub>1-2</sub>(bb15)-PEG und die zugehörigen Solubilisatoren Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>0.85k</sub>, Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG, Cremophor ELP, Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG und Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG bestimmt. Gegenstand der Messungen waren die Autokorrelationsfunktionen der Systeme bei einer Konjugatkonzentration von 0.37 mM und einem Streuwinkel von 173°. Alle daraus berechneten hydrodynamischen Radien der Systeme und Solubilisatoren wurden in den **Tabellen 20-24** aufgeführt. Es wurde kein Wert für den R<sub>h</sub> angegeben, wenn dieser unterhalb der Nachweisgrenze des Zetasizers (5 nm) lag.<sup>[8b, 153, 162]</sup>

**Tab. 20.** Übersicht der  $R_h$  für die Systeme B4A1/Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und B4A1/Cremophor ELP, sowie die  $R_h$  für die zugehörigen Solubilisatoren Pep<sub>1-3</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG und Cremophor ELP.<sup>[8b]</sup>

System	$R_h$ [nm]
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>3</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	nicht messbar
Cremophor ELP	13
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	105
B4A1/Pep <sub>2</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	175
B4A1/Pep <sub>3</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG	110
B4A1/Cremophor ELP	12

**Tab. 21.** Darstellung der  $R_h$  für die Solubilisatoren Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>5.2k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>1.4k</sub>, Pep<sub>1</sub><sup>(B4A1)</sup>-PEG<sub>0.85k</sub>, vor und nach der Beladung mit dem Wirkstoff B4A1 in wässriger Lösung.<sup>[162]</sup>

System	$R_h$ [nm]
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>5.2k</sub>	nicht messbar
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>3.2k</sub>	nicht messbar
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>1.4k</sub>	nicht messbar
Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>0.85k</sub>	nicht messbar
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>5.2k</sub>	200
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>3.2k</sub>	105
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>1.4k</sub>	100
B4A1/Pep <sub>1</sub> <sup>(B4A1)</sup> -PEG <sub>0.85k</sub>	nicht messbar

**Tab. 22.** Übersicht der  $R_h$  für alle bb14-affinen Solubilisatoren bb14/Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb14)</sup>-PEG. Die Radien wurden für die Solubilisatoren vor und nach der Beladung mit bb14 in wässriger Lösung bestimmt.<sup>[8b]</sup>

System	$R_h$ [nm]
Pep <sub>1</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>2</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>3</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG	nicht messbar
bb14/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG	70
bb14/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG	62
bb14/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb14)</sup> -PEG	61

**Tab. 23.** In Abhängigkeit von unterschiedlichen Peptid-Polymer-Konjugaten mit hoher Affinität zum Wirkstoff bb17 (Pep<sub>1-3</sub><sup>(bb17)</sup>-PEG) wurden verschiedene R<sub>h</sub> vor und nach der Beladung mit bb17 bestimmt und in einer Übersicht dargestellt.<sup>[153]</sup>

System	R <sub>h</sub> [nm]
Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	nicht messbar
bb17/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	56
bb17/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	71
bb17/Pep <sub>3</sub> <sup>(bb17)</sup> -PEG	55

**Tab. 24.** Tabellarische Darstellung der R<sub>h</sub> der Solubilisatoren Pep<sub>1-2</sub><sup>(bb15)</sup>-PEG in wässriger Lösung vor und nach der Beladung mit bb15.<sup>[153]</sup>

System	R <sub>h</sub> [nm]
Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	nicht messbar
Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	nicht messbar
bb15/Pep <sub>1</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	63
bb15/Pep <sub>2</sub> <sup>(bb15)</sup> -PEG	49

#### 6.4.3. Modellierung der Wirkstoff-Peptid-Wechselwirkungen<sup>[8b]</sup>

Alle Molekulardynamik-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit A. Grafmüller (Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächen, Abteilung Theorie & Bio-Systeme, Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam, GER) für B4A1 und die jeweiligen Peptide angefertigt. Die Simulationen erfolgten unter der Nutzung von Kraftfeld-Parametern des *Amber SB99 Kraftfelds*<sup>[181]</sup> für die Peptide und des generellen *Amber Kraftfelds*<sup>[182]</sup> für den Wirkstoff B4A1. Durch *R.E.D. tools scripts*<sup>[183]</sup> wurden Partialladungen für die Moleküle erhalten und auf eine Gesamtladung von 0.0 gesetzt. Durch Gauß (HF/6-31G\* Theorie-Level) wurde die Strukturoptimierung der Moleküle erreicht. Die endgültige Zusammenstellung der Ladungen wurde als Durchschnitt aus 40 Strukturen erhalten, die aus den letzten 20 ns einer 30 ns MD-Trajektorie generiert wurden. Die Anfangs-Strukturen der Peptide wurden mit TIP3P-Wasser<sup>[182]</sup> konstruiert und solvatisiert. Alle Gegenionen wurden in *tleap* eingefügt. Anschließend wurde die Topologie im *glycam2gmx.pl script*<sup>[184]</sup> umgewandelt. Je 20 verschiedene Simulationen wurden für jedes Peptid equilibriert und für je 50 ns mit dem Programm *gromacs 4.6.4*<sup>[185]</sup> durchgeführt. Die Simulationen wurden bei einem konstanten Druck von 1 bar und einer konstanten Temperatur von 310 K durchgeführt. Überprüft wurden die Einstellungen mit einem Berendsen-Barostat, bzw. einem *v-Rescale*-Thermostaten. Mithilfe der Ewald-Methode<sup>[186]</sup> wurden alle elektrostatischen Eigenschaften berechnet. Durch das Programm SETTLE<sup>[187]</sup> wurden die Wasser-Moleküle starr gehalten.  $\pi\pi$ -Wechselwirkungen wurden bis zu einer Distanz von 4.5 Å und einem  $\cos^2(\alpha) > 0.6$  für die



parallelen Wechselwirkungen definiert und bis zu einer Distanz von 5.5 Å und einem  $\cos^2(\alpha) < 0.4$  für die senkrechten Wechselwirkungen. Wasserstoffbrückenbindungen wurden für einen Abstand bis zu 3.5 Å und einem Winkel von 30° festgelegt.

## 6.5. Anwendung der Wirkstoff-Konjugat-Komplexe in Biotests

Alle vorliegenden Biotests wurden in der Arbeitsgruppe von E. Mandelkow von M. Pickhardt (DZNE, Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, GER) durchgeführt.

### 6.5.1. *In vitro* Tau Experimente

*Tau-Expression und die Aufreinigung des Proteins*<sup>[8b, 153, 162]</sup>: Das Tau-Konstrukt, das die Tau-Repeat-Domäne Tau<sup>3RD</sup> repräsentiert (3 Wiederholungseinheiten, (M)Q244-S372 mit fehlendem V275-S305, 99 Reste) wurde in einem pNG2-Vektor exprimiert. Dieser stellte ein Derivat von pET-3a (Merck-Novagen, Darmstadt, GER) im E.coli-Stamm BL21 (DE3) (Merck-Novagen, Darmstadt, GER) dar.<sup>[188]</sup> Unter Ausnutzung der Hitze-Resistenz des exprimierten Proteins konnte dieses aus dem bakteriellen Extrakt aufgereinigt werden. So konnte das Zell-Pellet in einem siedenden Extraktions-Puffer (50 mM MES, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, pH 6.8) resuspendiert werden, der mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/mL Aprotinin, 1 µg/mL Pepstatin) versetzt war. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine *French pressure cell*. Anschließend wurde der Rückstand für 20 min aufgeköcht. Durch Zentrifugation wurde der lösliche Zell-Extrakt abgetrennt und der Überstand gegen einen Kation-Austausch-Chromatografie-Puffer A (20 mM MES, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH = 6.8) auf einer Kation-Austausch *SP-Sepharose*-Säule (GE Healthcare) dialysiert. Unter Verwendung des Kation-Austausch-Chromatografie-Puffers B (20 mM MES, 1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH = 6.8) wurde das Protein mit einem linearen Gradienten eluiert. Die Einengung erfolgte an einem *Amicon Ultra-15* Gerät (Millipore, Bedford, MA). Um Tau-Abbruch-Produkte vom Protein abzutrennen, wurde es mit PBS-Puffer (pH = 7.4; 1 mM DTT) eluiert. Mithilfe von SDS-PAGE wurde die Reinheit des Proteins auf 17% ermittelt.

*Thioflavin-S in vitro Biotest*<sup>[35]</sup> *der Inhibition der Tau<sup>3RD</sup>-Aggregation*<sup>[153, 162]</sup>: Ein Großteil der bb17- bzw. bb15-affinen Systeme wurde auf deren Fähigkeit, die Aggregation des Tau-Protein-Konstrukts K19 zu inhibieren, untersucht. Die Wirkstoffe, Konjugate und Wirkstoff-Konjugat-Komplexe wurden in einem Konzentrationsbereich von 2 nM bis 20 µM (im Komplex beziehen sich diese Angaben auf die Wirkstoff-Konzentration) eingesetzt. Dies entspricht einem molaren Verhältnis des Wirkstoffs zum Tau<sup>3RD</sup>-Protein von 0.0002:1 bis 2:1. Dafür wurden das Tau-Konstrukt, die zu testenden Wirkstoff-Systeme und Heparin<sub>3000</sub>, das die Protein-Aggregation induzierte, durchmischt und über Nacht (16 h) bei 37°C in 50 mM NaAc (pH=6.8) inkubiert. Dabei entsprach das molare Verhältnis von Heparin:Tau<sup>3RD</sup> 1:4.<sup>[189]</sup> Abschließend wurden die Proben mit 20 µM ThS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Fibrillenbildung-, bzw. deren Inhibition, quantifizieren zu können. Bei einer

Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm konnte die Quantifizierung durchgeführt werden.

*Thioflavin-S in vitro Biotest<sup>[35]</sup> der Deaggregation von Tau<sup>3RD</sup>-Aggregaten<sup>[8b]</sup>*: Zur Ausbildung helikaler Filamente wurde das Tau<sup>3RD</sup>-Konstrukt K19 (10 µM) über Nacht bei 37°C in 50 mM NaAc (pH = 6.8) in Gegenwart von Heparin<sub>3000</sub> (2.5 µM) inkubiert. Anschließend wurden die Konstrukte mit den entsprechenden Wirkstoffen, Peptiden, Konjugaten und Wirkstoff-Konjugat-Komplexen in unterschiedlichen Konzentrationen über Nacht (16 h) bei 37°C inkubiert. Für alle B4A1-zugehörigen Systeme wurde ein Konzentrationsbereich von 200 pM bis 200 µM getestet (in den Komplexen beziehen sich diese Angaben auf den B4A1-Gehalt). Abschließend wurden die Proben mit 20 µM ThS versetzt (Protein/ThS-Verhältnis: 1:2) und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenzmessungen der Proben erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm.

### **6.5.2. Zellapoptose<sup>[8b, 153]</sup>**

Die ausgewählten Wirkstoffe, Konjugate und Wirkstoff-Konjugat-Komplexe wurden auf die Fähigkeit der Reduktion der N2a-Zellapoptose getestet, die durch die Aggregation des Tau<sup>4RD</sup>ΔK280-Konstrukts ausgelöst wird.<sup>[66]</sup> Dazu wurden N2a-Zellen, die das Tau<sup>4RD</sup>ΔK280 exprimierten für 4 d mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Dies wurde in Gegenwart von Doxycyclin (Dox) durchgeführt, das die Induzierung und Beschleunigung der Tau-Protein-Aggregation bewirkte.<sup>[66]</sup> Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte durch die Detektion von Phosphatidylserin auf der äußeren Hälfte der Zellmembranen. Dafür wurde das spezifisch an apoptotische Zellen bindende AnnV durch Allophycocyanin (APC-Annexin V, Pharmingen, Cat. No.: 561012) markiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte durch FACS bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einer Emissionswellenlänge von 650-670 nm. Der gesamte Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Ergebnisse repräsentieren 30 000 Messungen pro Probe mit einer Standardabweichung < 1%.

### **6.5.3. Inhibierung der Tau-Protein-Aggregation in N2a-Zelltests<sup>[153]</sup>**

Die N2a-Zellen wurden in Gegenwart von Doxycyclin, das die Tau-Protein-Aggregation induzierte, mit den Wirkstoffen, Konjugaten und Wirkstoff-Konjugat-Komplexen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und mithilfe einer *Neubauer Zählkammer* oder FACS gezählt. Nach der Zentrifugation der Zellen (20 min, 1220 rpm = 20 000 g, 4°C) wurde der Pellet mit flüssigem Stickstoff Schock-gefriergetrocknet und bei -80°C gelagert. Die Lyse der Zellen wurde bei einer Konzentration von 10 000-50 000 Zellen pro µL im Lyse-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 5% Glycerin, 0.5% NP40, 2.5 mM DTT, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 0.5 mM NaEGTA/EGTA, 0.5 mM Vanadat/Natriumorthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 5 mM CHAPS, 1 x *complete-minimix* (Roche #1836153), 100 Einheiten Benzoase, 5 µM

Okadasäure) durchgeführt. Ultraschall der Zellen erfolgte fünf Mal für 15 s mit Eiskühlung für 5 s. Die Proben wurden bei -20°C gelagert, sofern sie nicht sofort weitervernetzt wurden. Für die Durchführung des Pellet-Biotests wurden 50 000 Zellen (50 000 rpm, 1 h, 4°C) in einer Optima<sup>TM</sup>MAX (Beckman-Coulter) zentrifugiert. Nach der Trennung des Überstands und Pellets erfolgte die Analyse der Zellen mit 17% SDS-PAGE-Elektrophorese. Abschließend wurde ein Westernblot mit dem pan-Tau-Antikörper K9JA durchgeführt.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] (a) B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 9215-9219; (b) I. O. Korolev, *Medical Student Research Journal* **2014**, *4*, 24-33.
- [2] M. Pickhardt, J. Biernat, I. Khlistunova, Y. P. Wang, Z. Gazova, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Current Alzheimer Research* **2007**, *4*, 397-402.
- [3] A. Tjernberg, N. Markova, W. J. Griffiths, D. Hallén, *Journal of Biomolecular Screening* **2005**, *11*, 131-137.
- [4] (a) I. Khan, K. Saeed, I. Khan, *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, in Druck; (b) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2064-2110.
- [5] D. Taylor, *Pharmaceuticals in the Environment* **2016**, 1-33.
- [6] S. Dunne, B. Shannon, C. Dunne, W. Cullen, *BMC Pharmacology and Toxicology* **2013**, *14*, 1-19.
- [7] P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun, J. Lee, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *9*, 304-316.
- [8] (a) J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, 67-73; (b) C. Lawatscheck, M. Pickhardt, S. Wiczorek, A. Grafmüller, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 8752-8756; Herausgeber: John Wiley and Sons. Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; (c) C. Lawatscheck, M. Pickhardt, S. Wiczorek, A. Grafmüller, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Angewandte Chemie* **2016**, *128*, 8894-8899; Herausgeber: John Wiley and Sons. Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [9] A. Beig, J. M. Miller, A. Dahan, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, *81*, 386-391.
- [10] M. E. Herbig, D.-H. Evers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, *85*, 158-160.
- [11] K. Herrup, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2010**, *30*, 16755-16762.
- [12] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8*, 101-112.
- [13] (a) S. Wiczorek, E. Krause, S. Hackbarth, B. Röder, A. K. H. Hirsch, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 1711-1714; (b) A. K. H. Hirsch, F. Diederich, M. Antonietti, H. G. Börner, *Soft Matter* **2010**, *6*, 88-91.
- [14] H. Hippus, G. Neundörfer, *Dialogues in Clinical Neuroscience* **2003**, *5*, 101-108.
- [15] K. Maurer, S. Volk, H. Gerbaldo, *The Lancet* **1997**, *349*, 1546-1549.

- [16] B. Bulic, M. Pickhardt, E. Mandelkow, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 4135-4155.
- [17] M. Smith, A. Atkin, C. Cutler, *Journal of Aging and Health* **2017**, 29, 68-98.
- [18] A. Lobo, L. J. Launer, L. Fratiglioni, K. Andersen, A. Di Carlo, M. M. Breteler, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, C. Jagger, J. Martinez-Lage, H. Soininen, A. Hofman, *Neurology* **2000**, 54, supplement 5, S4-S9.
- [19] *Alzheimer's & Dementia* **2015**, 11, 332-384.
- [20] C. Qiu, M. Kivipelto, E. von Strauss, *Dialogues in Clinical Neuroscience* **2009**, 11, 111-128.
- [21] J. Cummings, P. S. Aisen, B. DuBois, L. Frölich, C. R. Jack, R. W. Jones, J. C. Morris, J. Raskin, S. A. Dowsett, P. Scheltens, *Alzheimer's Research & Therapy* **2016**, 8, 39-51.
- [22] <https://www.alzforum.org/therapeutics>, abgerufen am 11.06.2017.
- [23] T.-V. V. Nguyen, V. Galvan, W. Huang, S. Banwait, H. Tang, J. Zhang, D. E. Bredesen, *Journal of neurochemistry* **2008**, 104, 1065-1080.
- [24] T. G. Williamson, S. S. Mok, A. Henry, R. Cappai, A. D. Lander, V. Nurcombe, K. Beyreuther, C. L. Masters, D. H. Small, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 31215-31221.
- [25] S. H. Mokhtar, M. M. Bakhuraysah, D. S. Cram, S. Petratos, *International Journal of Alzheimer's Disease* **2013**, 2013, 910502-910517.
- [26] B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt, E.-M. Mandelkow, H. Waldmann, E. Mandelkow, *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 1772-1785.
- [27] C. M. Wischik, C. R. Harrington, J. M. D. Storey, *Biochemical Pharmacology* **2014**, 88, 529-539.
- [28] G. S. Bloom, *JAMA Neurology* **2014**, 71, 505-508.
- [29] E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Trends in Cell Biology* **1998**, 8, 425-427.
- [30] (a) S. Barghorn, P. Davies, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2004**, 43, 1694-1703;  
(b) M. Kidd, *Nature* **1963**, 197, 192-193.
- [31] A. Serrano-Pozo, M. P. Frosch, E. Masliah, B. T. Hyman, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2011**, 1, a006189.
- [32] R. B. Maccioni, G. Farías, I. Morales, L. Navarrete, *Archives of Medical Research* **2010**, 41, 226-231.
- [33] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 5129-5134.

- [34] Y. Luo, B. Ma, R. Nussinov, G. Wei, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, 5, 3026-3031.
- [35] Reproduziert aus *Neuropharmacology*, 59, B. Bulic, M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, Tau protein and tau aggregation inhibitors, 276-289, Copyright 2010 mit Erlaubnis von Elsevier.
- [36] M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, A. Hascher, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Current Alzheimer Research* **2005**, 2, 219-226.
- [37] Y. Hong-Qi, S. Zhi-Kun, C. Sheng-Di, *Translational Neurodegeneration* **2012**, 1, 21-33.
- [38] H.-W. Klafki, M. Staufenbiel, J. Kornhuber, J. Wiltfang, *Brain* **2006**, 129, 2840-2855.
- [39] E. Scarpini, P. Schelterns, H. Feldman, *The Lancet Neurology* **2003**, 2, 539-547.
- [40] (a) P. J. Whitehouse, A. M. Martino, P. G. Antuono, P. R. Lowenstein, J. T. Coyle, D. L. Price, K. J. Kellar, *Brain Research* **1986**, 371, 146-151; (b) P. Newhouse, A. Potter, E. Levin, *Drugs Aging* **1997**, 11, 206-228.
- [41] R. T. Bartus, R. L. Dean, M. J. Pontecorvo, C. Flicker, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1985**, 444, 332-358.
- [42] S. Auriacombe, J. J. Pere, Y. Loria-Kanza, B. Vellas, *Current Medical Research and Opinion* **2002**, 18, 129-138.
- [43] (a) M. Emre, *International Journal of Clinical Practice* **2002**, 127, 64-72 (b) S. H. Ferris, *Clinical Therapeutics* **2001**, 23, A3-A7.
- [44] S. J. Thomas, G. T. Grossberg, *Clinical Interventions in Aging* **2009**, 4, 367-377.
- [45] W. Danysz, C. G. Parsons, *British Journal of Pharmacology* **2012**, 167, 324-352.
- [46] T. V. P. Bliss, G. L. Collingridge, *Nature* **1993**, 361, 31-39.
- [47] J. T. Greenamyre, A. B. Young, *Neurobiology of Aging* **1989**, 10, 593-602.
- [48] (a) A. Nordberg, *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **2006**, 20, S12-S18; (b) H.-M. Wu, N.-S. Tzeng, L. Qian, S.-J. Wei, X. Hu, S. M. Rawls, P. Flood, J.-S. Hong, R.-B. Lu, *Neuropsychopharmacology* **2009**, 34, 2344-2357.
- [49] S. Salomone, F. Caraci, G. M. Leggio, J. Fedotova, F. Drago, *British Journal of Clinical Pharmacology* **2012**, 73, 504-517.
- [50] K. G. Yiannopoulou, S. G. Papageorgiou, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* **2013**, 6, 19-33.
- [51] R. F. Zec, N. R. Burkett, *NeuroRehabilitation* **2008**, 23, 425-438.
- [52] C. G. Lyketsos, L. DelCampo, M. Steinberg, Q. Miles, C. D. Steele, C. Munro, A. S. Baker, J. M. Sheppard, C. Frangakis, J. Brandt, P. V. Rabins, *Archives of General Psychiatry* **2003**, 60, 737-746.

- [53] S. Banerjee, J. Hellier, M. Dewey, R. Romeo, C. Ballard, R. Baldwin, P. Bentham, C. Fox, C. Holmes, C. Katona, M. Knapp, C. Lawton, J. Lindesay, G. Livingston, N. McCrae, E. Moniz-Cook, J. Murray, S. Nurock, M. Orrell, J. O'Brien, M. Poppe, A. Thomas, R. Walwyn, K. Wilson, A. Burns, *The Lancet* **2011**, 378, 403-411.
- [54] <https://www.alzforum.org/therapeutics/aducanumab>, abgerufen am 09.06.2018.
- [55] <https://www.alzforum.org/therapeutics/gantenerumab>, abgerufen am 09.06.2018.
- [56] <https://www.alzforum.org/therapeutics/elenbecestat>, abgerufen am 09.06.2018.
- [57] <https://www.alzforum.org/therapeutics/gc-021109>, abgerufen am 09.06.2018.
- [58] <https://www.alzforum.org/therapeutics/neflamapimod>, abgerufen am 09.06.2018.
- [59] <https://www.alzforum.org/therapeutics/etanercept>, abgerufen am 09.06.2018.
- [60] I. Kelleher, C. Garwood, D. P. Hanger, B. H. Anderton, W. Noble, *Journal of Neurochemistry* **2007**, 103, 2256-2267.
- [61] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, 3-26.
- [62] M. Pickhardt, Z. Gazova, M. von Bergen, I. Khlistunova, Y. Wang, A. Hascher, E.-M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 3628-3635.
- [63] E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Environmental Mutagenesis* **1987**, 9, 61-109.
- [64] N. Hotta, Y. Akanuma, R. Kawamori, K. Matsuoka, Y. Oka, M. Shichiri, T. Toyota, M. Nakashima, I. Yoshimura, N. Sakamoto, Y. Shigeta, *Diabetes Care* **2006**, 29, 1538-1544.
- [65] G. A. Patani, E. J. LaVoie, *Chemical Reviews* **1996**, 96, 3147-3176.
- [66] I. Khlistunova, J. Biernat, Y. Wang, M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 1205-1214.
- [67] U. R. Anumala, J. Gu, F. Lo Monte, T. Kramer, R. Heyny-von Haußen, J. Hölzer, V. Goetschy-Meyer, C. Schön, G. Mall, I. Hilger, C. Czech, J. Herms, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 5139-5144.
- [68] C. Fatouros, G. J. Pir, J. Biernat, S. P. Koushika, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, E. Schmidt, R. Baumeister, *Human Molecular Genetics* **2012**, 21, 3587-3603.
- [69] D. R. Howlett, *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents* **2001**, 1, 25-38.
- [70] M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E.-M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2007**, 46, 10016-10023.

- [71] A. Coksezen: *Untersuchungen von Inhibitoren der pathologischen Aggregation des Tau-Proteins bei der Alzheimer Krankheit*, Dissertation, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg (Hamburg), **2007**.
- [72] H. Yu, A. Adedoyin, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 852-861.
- [73] E. Bielska, X. Lucas, A. Czerwoniec, J. M. Kasprzak, K. H. Kaminska, J. M. Bujnicki, *BioTechnologia* **2014**, 92, 249-264.
- [74] A. R. Leach, B. K. Shoichet, C. E. Peishoff, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 5851-5855.
- [75] G. R. Robb, D. McKerrecher, N. J. Newcombe, M. J. Waring, *Drug Discovery Today* **2013**, 18, 141-147.
- [76] P. Aparoy, K. Kumar Reddy, P. Reddanna, *Current Medicinal Chemistry* **2012**, 19, 3763-3778.
- [77] (a) J. Drews, *Science* **2000**, 287, 1960-1964; (b) J. B. Moon, W. J. Howe, *Proteins* **1991**, 11, 314-328.
- [78] C.-H. Lee, H.-C. Huang, H.-F. Juan, *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, 12, 5304-5318.
- [79] C. Tintori, F. Manetti, M. Botta, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2010**, 10, 1019-1035.
- [80] A. C. Anderson, *Chemistry & Biology* **2003**, 10, 787-797.
- [81] (a) A. Nickerson, N. J. McKinnon, N. Roberts, L. Saulnier, *Healthcare Quarterly* **2005**, 8, 65-72; (b) L. M. Strand, P. C. Morley, R. J. Cipolle, R. Ramsey, G. D. Lamsam, *Annals of Pharmacotherapy* **1990**, 24, 1093-1097.
- [82] R. H. B. Meyboom, M. Lindquist, A. C. G. Egberts, *Drug Safety* **2000**, 22, 415-423.
- [83] H. Bajaj, S. Bisht, M. Yadav, V. Singh, *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2011**, 2, 202-216.
- [84] K. C. Johnson, A. C. Swindell, *Pharmaceutical Research* **1996**, 13, 1795-1798.
- [85] G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, J. R. Crison, *Pharmaceutical Research* **1995**, 12, 413-420.
- [86] H. D. Williams, N. L. Trevaskis, S. A. Charman, R. M. Shanker, W. N. Charman, C. W. Pouton, C. J. H. Porter, *Pharmacological Reviews* **2013**, 65, 315-499.
- [87] S. Kalepu, V. Nekkanti, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, 5, 442-453.
- [88] D. C. Vimalson, S. Parimalakrishnan, N. S. Jeganathan, S. Anbazhagan, *Asian Journal of Pharmaceutics (Suppl)* **2016**, 10, S67-S75.
- [89] C. Wischke, S. P. Schwendeman, *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 364, 298-327.



- [90] K. T. Savjani, A. K. Gajjar, J. K. Savjani, *ISRN Pharmaceutics* **2012**, 2012, 195727-195737.
- [91] N. Rasenack, B. W. Müller, *Pharmaceutical Development and Technology* **2004**, 9, 1-13.
- [92] T. Patole, A. Deshpande, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2014**, 5, 3566-3576.
- [93] R. V. Prasad, M. G. Rakesh, R. M. Jyotsna, S. T. Mangesh, P. Sapkale, A. K. Mayur, P. K. Mayur, *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* **2012**, 1, 1074-1085.
- [94] S. A. Rahim, R. B. Hammond, A. Y. Sheikh, K. J. Roberts, *CrystEngComm* **2013**, 15, 3862-3873.
- [95] A. Chaudhary, D. U. Nagaich, N. Gulati, V. K. Sharma, R. L. Khosa, *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* **2012**, 2, 32-67.
- [96] V. R. Vemula, V. Lagishetty, S. Lingala, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2010**, 5, 41-51.
- [97] T. Loftsson, *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, 531, 276-280.
- [98] U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman, *Drug Design, Development and Therapy* **2017**, 11, 599-616.
- [99] S. G. Frank, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1975**, 64, 1585-1604.
- [100] S. Takahashi, N. L. Yamada, K. Ito, H. Yokoyama, *Macromolecules* **2016**, 49, 6947-6952.
- [101] A. Pandita, P. Sharma, *ISRN Pharmaceutics* **2013**, 2013, 1-10.
- [102] A. T. M. Serajuddin, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59, 603-616.
- [103] P. Makary, *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences* **2014**, 2, 1-4.
- [104] R. J. Bastin, M. J. Bowker, B. J. Slater, *Organic Process Research & Development* **2000**, 4, 427-435.
- [105] D. Fleisher, R. Bong, B. H. Stewart, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, 19, 115-130.
- [106] A. Jouyban, *Jornal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **2008**, 11, 32-58.
- [107] C. L. Burnett, B. Heldreth, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen, *International Journal of Toxicology* **2014**, 33, 13S-39S.
- [108] (a) Y. Zhang, H. F. Chan, K. W. Leong, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 104-120; (b) V. Alakhov, E. Klinski, S. Li, G. Pietrzynski, A. Venne, E. Batrakova, T. Bronitch, A. Kabanov, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 16, 113-134.

- [109] P. V. Sapkale, M. A. Chaudhari, N. B. Chaudhari, M. Sahu, A. R. Bendale, A. G. Jadhav, *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences* **2013**, 1, 243-250.
- [110] L. A. Mitscher, A. Dutta, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* **2003**, 2, 1-36.
- [111] A. Rasheed, R. Farhat, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2013**, 4, 2502-2516.
- [112] D. M. Coe, R. Storer, *Molecular Diversity* **1998**, 4, 31-38.
- [113] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154.
- [114] G. A. Truran, K. S. Aiken, T. R. Fleming, P. J. Webb, J. H. Markgraf, *Journal of Chemical Education* **2002**, 79, 85.
- [115] N. A. Boyle, K. D. Janda, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6, 339-346.
- [116] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, *Molecular Immunology* **1986**, 23, 709-715.
- [117] Á. Furka, *Drug Development Research* **1995**, 36, 1-12.
- [118] B. Maiti, U. Haldar, T. Rajasekhar, P. De, *Chemistry – A European Journal* **2017**, 23, 15156-15165.
- [119] M. I. Gibson, E. Fröhlich, H.-A. Klok, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, 47, 4332-4345.
- [120] K. Dan, R. Pan, S. Ghosh, *Langmuir* **2010**, 27, 612-617.
- [121] J. Y. Shu, B. Panganiban, T. Xu, *Annual Review of Physical Chemistry* **2013**, 64, 631-657.
- [122] A. Meszynska, N. Badi, H. G. Börner, J.-F. Lutz, *Chemical Communications* **2012**, 48, 3887-3889.
- [123] V. Samsoninkova, B. Seidt, F. Hanßke, W. Wagermaier, H. G. Börner, *Advanced Materials Interfaces* **2017**, 4, 1600501-1600506.
- [124] T. Schwemmer, J. Baumgartner, D. Faivre, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 2385-2391.
- [125] P. Wilke, H. G. Börner, *European Polymer Journal* **2015**, 62, 374-379.
- [126] M. A. Gauthier, H.-A. Klok, *Chemical Communications* **2008**, 2591-2611.
- [127] P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, 73, 243-254.
- [128] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discovery Today* **2005**, 10, 1451-1458.
- [129] J. M. Antos, M. B. Francis, *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10, 253-262.

- [130] S. D. Tilley, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1080-1081.
- [131] H. Gao, K. Matyjaszewski, *Progress in Polymer Science* **2009**, *34*, 317-350.
- [132] I. W. Hamley, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1543-1559.
- [133] M. R. J. Vallée, P. Majkut, I. Wilkening, C. Weise, G. Müller, C. P. R. Hackenberger, *Organic Letters* **2011**, *13*, 5440-5443.
- [134] A. Rösler, H.-A. Klok, I. W. Hamley, V. Castelletto, O. O. Mykhaylyk, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 859-863.
- [135] G. M. Whitesides, M. Boncheva, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 4769-4774.
- [136] J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshchev, S. Santer, M. Biesalski, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 3297-3301.
- [137] H. Kühnle, H. G. Börner, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6431-6434.
- [138] B. Apostolovic, S. P. E. Deacon, R. Duncan, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1187-1195.
- [139] V. P. Torchilin, *Pharmaceutical Research* **2006**, *24*, 1-24.
- [140] H. Dong, N. Dube, J. Y. Shu, J. W. Seo, L. M. Mahakian, K. W. Ferrara, T. Xu, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5320-5329.
- [141] M. Danial, M. J. Root, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1438-1447.
- [142] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 47.
- [143] H. G. Börner, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32*, 115-126.
- [144] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6288-6308.
- [145] M. O. Senge, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2012**, *9*, 170-179.
- [146] S. Wieczorek, T. Schwaar, M. O. Senge, H. G. Börner, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3308-3312.
- [147] S. Wieczorek, S. Vigne, T. Masini, D. Ponader, L. Hartmann, A. K. H. Hirsch, H. G. Börner, *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15*, 82-89.
- [148] S. Wieczorek, A. Dallmann, Z. Kochovski, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 9349-9352.
- [149] M. Pickhardt, **Laborbericht 19.11.2014**.
- [150] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.

- [151] (a) R. Behrendt, P. White, J. Offer, *Journal of Peptide Science* **2016**, 22, 4-27;  
(b) E. Atherton, R. C. Sheppard, P. Ward, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1985**, 2065-2073.
- [152] (a) F.-I. Auzanneau, M. Meldal, K. Bock, *Journal of Peptide Science* **1995**, 1, 31-44;  
(b) Y. García-Ramos, M. Paradis-Bas, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Journal of Peptide Science* **2010**, 16, 675-678.
- [153] Neu veröffentlicht mit Erlaubnis von Bentham Science aus *Inhibition of Tau Protein Aggregation by Rhodanine-based Compounds Solubilized Via Specific Formulation Additives to Improve Bioavailability and Cell Viability* von E. Mandelkow, M. Pickhardt, C. Lawatscheck, H. G. Börner, *Current Alzheimer Research* **2017**, 14, 742-752. Copyright 2018 Bentham Science Publishers. Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc vermittelt.
- [154] I. Geiman, M. Leona, J. R. Lombardi, *Journal of Forensic Sciences* **2009**, 54, 947-952.
- [155] A. C. Wiesheu, Technische Universität München **2017**.
- [156] M. M. Kubota, B. L. Sacco, D. C. Bento, H. de Santana, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, 151, 80-88.
- [157] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis* **1999**, 20, 3551-3567.
- [158] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, 1-39.
- [159] V. P. Torchilin, *Journal of Controlled Release* **2001**, 73, 137-172.
- [160] R. T. Chacko, J. Ventura, J. Zhuang, S. Thayumanavan, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 836-851.
- [161] V. P. Torchilin, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 11, S81-S91.
- [162] C. Lawatscheck, M. Pickhardt, A. Grafl, K. Linkert, F. Polster, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Macromolecular Bioscience* **2017**, 17, 1700109-1700117. Herausgeber: John Wiley and Sons. Copyright 2017 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [163] E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Journal of Controlled Release* **2008**, 130, 98-106.
- [164] Kooperation mit der Gruppe E. Mandelkow. Ausführung der Experimente durch M. Pickhardt.
- [165] S. Barghorn, Q. Zheng-Fischhöfer, M. Ackmann, J. Biernat, M. von Bergen, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2000**, 39, 11714-11721.
- [166] D. S. Dwyer (2008): *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley and Sons (Hrsg.). Copyright 2008, John Wiley and Sons.
- [167] S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Linhardt, D. C. Rees, *Science* **1996**, 271, 1116-1120.

- [168] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutellingsperger, *Journal of Immunological Methods* **1995**, *184*, 39-51.
- [169] J. M. Besterman, R. B. Low, *The Biochemical journal* **1983**, *210*, 1-13.
- [170] S. Wieczorek, *Ein kombinatorischer Ansatz zur Entwicklung von spezifischen Löslichkeitsvermittlern für niedermolekulare Wirkstoffe*, Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät **2016**.
- [171] (a) M. O. Senge, J. C. Brandt, *Photochemistry and Photobiology* **2011**, *87*, 1240-1296; (b) C. Hopper, A. Kübler, H. Lewis, I. B. Tan, G. Putnam, *International Journal of Cancer* **2004**, *111*, 138-146.
- [172] P.-G. de Gennes, *Angewandte Chemie International Edition* **1992**, *31*, 842-845.
- [173] R. A. Shirwaiker, M. F. Purser, R. A. Wusk, *Rapid Prototyping of Biomaterials* **2014**, 176-200.
- [174] (a) J. Galvao, B. Davis, M. Tilley, E. Normando, M. R. Duchon, M. F. Cordeiro, *The FASEB Journal* **2014**, *28*, 1317-1330; (b) W. Qi, D. Ding, R. J. Salvi, *Hearing Research* **2008**, *236*, 52-60; (c) J. L. Hanslick, K. Lau, K. K. Noguchi, J. W. Olney, C. F. Zorumski, S. Mennerick, N. B. Farber, *Neurobiology of Disease* **2009**, *34*, 1-10.
- [175] (a) M. Rizzuti, M. Nizzardo, C. Zanetta, A. Ramirez, S. Corti, *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 76-85; (b) E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas, P. A. Wender, *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 2944-2954; (c) P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 13003-13008.
- [176] (a) S. Reissmann, *Journal of Peptide Science* **2014**, *20*, 760-784; (b) K. Montrose, G. W. Krissansen, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2014**, *453*, 735-740; (c) S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, A. T. Jones, *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35*, 784-787.
- [177] M. Kristensen, A. M. de Groot, J. Berthelsen, H. Franzyk, A. Sijts, H. M. Nielsen, *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 477-488.
- [178] L. Andersson, L. Blomberg, M. Flegel, L. Lepsa, B. Nilsson, M. Verlander, *Peptide Science* **2000**, *55*, 227-250.
- [179] N. ten Brummelhuis, P. Wilke, H. G. Börner, *Macromolecular Rapid Communications* **2017**, *38*, 1700632-1700649.
- [180] D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chemical Communications* **2005**, 2814-2816.
- [181] (a) V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, *Proteins* **2006**, *65*, 712-725; (b) J. Wang, P. Cieplak, P. A. Kollman, *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 1049-1074.
- [182] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1157-1174.

- [183] F.-Y. Dupradeau, A. Pigache, T. Zaffran, C. Savineau, R. Lelong, N. Grivel, D. Lelong, W. Rosanski, P. Cieplak, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12, 7821-7839.
- [184] (a) E. J. Sorin, V. S. Pande, *Biophysical journal* **2005**, 88, 2472-2493; (b) M. Wehle, I. Vilotijevic, R. Lipowsky, P. H. Seeberger, D. Varon Silva, M. Santer, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 18964-18972.
- [185] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26, 1701-1718.
- [186] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, 10089-10092.
- [187] S. Miyamoto, P. A. Kollman, *Journal of Computational Chemistry* **1992**, 13, 952-962.
- [188] N. Gustke, B. Trinczek, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1994**, 33, 9511-9522.
- [189] P. Friedhoff, A. Schneider, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1998**, 37, 10223-10230.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Ein- und Dreibuchstabencode der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Joint Commission on Biochemical Nomenclature verwendet (*European Journal of Biochemistry* **1984**, 138, 9-37).

ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer-Krankheit (engl.: Alzheimer Disease)
Ann V	Annexin V
APC	Allophycocyanin
Äq	Äquivalente
ATRP	Atomtransfer-Radikalpolymerisation
ber	berechnet
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (engl.: Biopharmaceutic Classification System)
C. elegans	Caenorhabditis elegans
ClogP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
CPP	zellpenetrierende Peptide (engl.: Cell-Penetrating Peptide)
DC <sub>50</sub>	halbmaximale Induktion der Deaggregation (engl.: Half maximal disassembly-inducing concentration)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	krankheitsmodifizierende Therapie (engl.: Disease Modifying Therapy)
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
EDT	1,2-Ethandithiol
EO	Ethylenoxid
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting)

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
Gew.-%	Gewichtsprozent
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: High-performance liquid chromatography)
HTS	Hochdurchsatzscreenings (engl.: High-Throughput Screening)
HTVS	Hochdurchsatz virtuelles Screening (engl.: High-Throughput Virtual Screening)
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration (engl.: Half maximal inhibitory concentration)
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie (engl.: Isothermal Titration Calorimetry)
LBDD	Ligand-basiertes Wirkstoffdesign (engl.: Ligand-based Drug Design)
MAD	maximal absorbierbare Dosis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
MD	Molekulardynamik
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<i>m</i> -THPC	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin
NCE	neuartige eigenständige Substanz (engl.: New Chemical Entity)
NFT	neurofibrilläres Bündel (engl.: Neurofibrillary Tangles)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMP	Nitroxid-vermittelte Polymerisation (engl.: Nitroxide-mediated Polymerization)
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palmitinsäure



PAP	engl.: PEG-attached peptide
PEG	Polyethylenglycol
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPFMA	Poly(pentafluorphenylmethacrylat)
PyBoP	Benzotriazol-1-yl-oxyltripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
QSAR	quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung (engl.: Quantitative Structure-Activity Relationship)
RAFT	reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (engl.: Reversible Addition–Fragmentation chain Transfer)
R <sub>h</sub>	hydrodynamischer Radius
RT	Raumtemperatur
S	Überstand (engl.: Supernatant)
SBDD	Struktur-basiertes Wirkstoffdesign (engl.: Structure-based Drug Design)
SPPS	Festphasensynthese (engl.: Solid Phase Synthesis)
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (engl.: Selective Serotonin Reuptake Inhibitor)
STD	Sättigungstransfer-Differenz
<i>t</i> -Bu	tert-Butyl
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: Trifluoroacetic Acid)
ThS	Thioflavin S
ToF	Flugzeit (engl.: Time-of-Flight)
Trt	Trityl
UV/Vis	ultraviolett/sichtbar (engl.: Ultraviolet/Visible)
ZNS	Zentralnervensystem

## Publikationsliste

- 2016 C. Lawatscheck, M. Pickhardt, S. Wieczorek, A. Grafmüller, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55, 8752-8756. „Generalizing the Concept of Specific Compound Formulation Additives towards Non-Fluorescent Drugs: A Solubilization Study on Potential Anti-Alzheimer-Active Small-Molecule Compounds“.
- 2017 E. Mandelkow, M. Pickhardt, C. Lawatscheck, H. G. Börner, *Current Alzheimer Research* **2017**, 14, 742-752. „Inhibition of Tau Protein Aggregation by Rhodanine-based Compounds Solubilized via Specific Formulation Additives to Improve Bioavailability and Cell Viability“.
- 2017 C. Lawatscheck, M. Pickhardt, A. Grafl, K. Linkert, F. Polster, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Macromolecular Bioscience* **2017**, 17, 1700109-1700116. „Gaining Insights into Specific Drug Formulation Additives for Solubilizing a Potential Anti-Alzheimer Disease Drug B4A1“.

## Beiträge der Autoren

Publikation: C. Lawatscheck, M. Pickhardt, S. Wieczorek, A. Grafmüller, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55, 8752-8756.

H. Börner, E. Mandelkow und C. Lawatscheck haben die Studien geplant. C. Lawatscheck und M. Pickhardt haben die zugehörigen Experimente durchgeführt. Diesbezüglich hat C. Lawatscheck alle Screeningprozeduren durchgeführt, alle Konjugate synthetisiert und mit den entsprechenden Wirkstoffen beladen, sowie alle analytischen Untersuchungen mit Ramanspektroskopie, IR, UV/Vis und DLS durchgeführt. C. Lawatscheck hat alle Proben für die Messungen mit MALDI, NMR und alle Proben für die Durchführung der Biotests selbst vorbereitet. M. Pickhardt hat alle angegebenen zellfreien und Zelltests durchgeführt. Die Auswertung der analytischen Messungen erfolgte durch C. Lawatscheck. Ramanmessungen wurden gemeinsam durch H. Börner und C. Lawatscheck diskutiert. Die Auswertung der Biotests erfolgte durch M. Pickhardt und E. Mandelkow in Zusammenarbeit mit H. Börner und C. Lawatscheck. Das Manuskript wurde von C. Lawatscheck und H. Börner angefertigt. Die MD-Simulationen wurden von A. Grafmüller durchgeführt. S. Wieczorek fertigte die Abbildungen 1 und 3 an und unterstützte bei der Auswertung der simulierten Daten. Die finale Version der Publikation wurde mit H. Börner, M. Pickhardt und E. Mandelkow besprochen und mit allen Autoren in Übereinstimmung abgeschlossen.

Publikation: E. Mandelkow, M. Pickhardt, C. Lawatscheck, H. G. Börner, *Current Alzheimer Research* **2017**, 14, 742-752.

H. Börner, E. Mandelkow, M. Pickhardt und C. Lawatscheck haben die Studien geplant. C. Lawatscheck und M. Pickhardt haben die zugehörigen Experimente durchgeführt. Diesbezüglich hat C. Lawatscheck alle Screeningprozeduren durchgeführt, alle Konjugate synthetisiert und mit den entsprechenden Wirkstoffen beladen, sowie alle analytischen Untersuchungen mit Fluoreszenzspektroskopie, IR, UV/Vis und DLS durchgeführt. C. Lawatscheck hat alle Proben für die Messungen mit MALDI, NMR und alle Proben für die Durchführung der Biotests selbst vorbereitet. M. Pickhardt hat alle angegebenen zellfreien und Zelltests durchgeführt. Die Auswertung der analytischen Messungen erfolgte durch C. Lawatscheck. Die Auswertung der Biotests erfolgte durch M. Pickhardt und E. Mandelkow in Zusammenarbeit mit H. Börner und C. Lawatscheck. Das Manuskript wurde von M. Pickhardt, C. Lawatscheck, H. Börner und E. Mandelkow angefertigt. Die finale Version der Publikation wurde mit H. Börner, M. Pickhardt und E. Mandelkow besprochen und mit allen Autoren in Übereinstimmung abgeschlossen.

Publikation: C. Lawatscheck, M. Pickhardt, A. Grafl, K. Linkert, F. Polster, E. Mandelkow, H. G. Börner, *Macromolecular Bioscience* **2017**, 17, 1700109-1700116.

H. Börner und C. Lawatscheck haben die Studien geplant. C. Lawatscheck und M. Pickhardt haben die zugehörigen Experimente durchgeführt. Diesbezüglich hat C. Lawatscheck alle

Screeningprozeduren durchgeführt, ca. 50% der Konjugate synthetisiert und mit den entsprechenden Wirkstoffen beladen, sowie alle analytischen Untersuchungen mit IR, UV/Vis und DLS durchgeführt. C. Lawatscheck hat alle Proben für die Messungen mit MALDI, NMR und alle Proben für die Durchführung der Biotests selbst vorbereitet. M. Pickhardt hat alle angegeben zellfreien und Zelltests durchgeführt. Die Auswertung der analytischen Messungen erfolgte durch C. Lawatscheck. Die Auswertung der Biotests erfolgte durch M. Pickhardt und E. Mandelkow in Zusammenarbeit mit H. Börner und C. Lawatscheck. Das Manuskript wurde von C. Lawatscheck, A. Grafl und H. Börner angefertigt. K. Linkert und F. Polster haben ca. 50% der verwendeten Konjugate synthetisiert. Die finale Version der Publikation wurde mit H. Börner, M. Pickhardt und E. Mandelkow besprochen und mit allen Autoren in Übereinstimmung abgeschlossen.

# Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. H. G. Börner für seine Unterstützung, Geduld und die Möglichkeit danken, ein solch abwechslungsreiches und spannendes Forschungsthema bearbeiten zu dürfen. Auch für die Initiative, mich endlich mit EndNote auseinanderzusetzen, möchte ich mich bedanken und die schönen Gruppenfahrten und Weihnachtsessen. Prof. C. Hackenberger und Prof. E. Mandelkow möchte ich danken, dass sie sich zur Begutachtung meiner Arbeit bereit erklärt haben.

Vielen vielen Dank auch an die Kooperationspartner Prof. E. Mandelkow, Dr. M. Pickhardt, Dr. B. Bulic, Dr. I. Krylova, Dr. E. Krause und H. Stephanowitz. Und an Dr. D. Steinmetz, dank dem ich sehr viel über Ramanmikroskope, Laser und Cantilever lernen durfte. Prof. N. Ernsting danke ich für die Hilfe bei den Laserreparaturen.

Meiner Familie möchte ich ganz herzlich danken, ganz besonders meiner Mama Birgit Stolze, meinem Bruder Thomas Stolze und meiner Schwester Lisa Stolze. Ohne euch hätte ich die Arbeit nicht beenden können. Danke, dass ihr euch für mich eingesetzt und mich unterstützt habt, auch wenn das Schreiben sehr lange gedauert hat. Und danke natürlich an Fiona, denn du hast ordentlich mitgeholfen, dass die Fertigstellung möglich wurde.

Von meinen Freunden möchte ich besonders Cindy Glor, Maria Baumann, Sebastian Gohr, Katrin Kraffert, Melanie Stadelmann, Fangfang Chu, Ilka Buchholz und Alexandra Hedwig danken. Ihr gehört für mich auch zur Familie. Danke, dass ihr mich so sehr unterstützt habt und an mich geglaubt habt. Danke auch an Cordelia Wiechert für die Bereitstellung eines Kitaplatzes.

Von meinen Kollegen möchte ich ganz besonders Sebastian Wieczorek und Felix Hansske für die Korrektur meiner Arbeit, die Motivation und Unterstützung danken. Ohne euch wäre die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen. Meiner Kollegin Katharina Linkert danke ich ganz besonders für die schöne Laboratmosphäre und unser Geheimfach.

Ich danke meinen Kollegen Katharina Linkert, Sebastian Wieczorek, Felix Hansske, Dario Remmler, Matthias Röber, Steffi Große, Maria Meißler, Patrick Wilke, Falk Kubatzki, Regina König, Kristine Oevel, Anna Grafl, Frank Polster, Eva Maron, Narendra Reddy, Felix Gandor, Stefan Peplau, Emanuelle Schue und Meral Yalcin für die tolle Laborzeit und natürlich die Gruppenfahrten, besonders die Fahrt nach Rostock.

Meinen Bacheloranten Kristine Oevel, Jan Felber und meinen Forschungspraktikanten Fabian Eisenreich, Svante Ihrig und Jan Felber danke ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit. Jan, ich danke dir auch für die schwierigen Diskussionen, denn sie haben mich (hoffentlich) wachsen lassen.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Carmen Lawatscheck, Berlin den 14.03.2019